

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Pat/EP03/09968

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 14 NOV 2003

WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 42 016.5  
**Anmeldetag:** 11. September 2002  
**Anmelder/Inhaber:** ESPLORA GmbH,  
Darmstadt/DE  
**Bezeichnung:** Verfahren zur Identifizierung BHS-spezifischer  
Proteine und Fragmente davon  
**IPC:** C 12 Q, C 07 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 02. Oktober 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
 Im Auftrag

**PRIORITY DOCUMENT**  
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
 COMPLIANCE WITH  
 RULE 17.1(a) OR (b)

100%  
BEST AVAILABLE COPY

---

5 Verfahren zur Identifizierung BHS-spezifischer Proteine und  
Fragmente davon

---

10 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung der  
Anwesenheit eines BHS-spezifischen Proteins oder Fragments  
davon in Hirnkapillar-Endothelzellen sowie die mit diesem  
Verfahren erhaltenen Proteine oder Fragmente davon  
(BHS = Blut-Hirn-Schranke). Ferner betrifft die Erfindung auch  
die mit diesem Verfahren erhaltenen Gene bzw. Transkripte.

15 Die Endothelzellen von cerebralen Kapillaren bilden eine  
selektive Permeabilitätsbarriere zwischen dem Blut und dem  
Gehirn eines Organismus, die so genannte Blut-Hirn-Schranke  
(BHS). Innerhalb der Kapillaren sind einzelne Endothelzellen  
um das Lumen herum angeordnet und bilden einen zylindrischen,  
röhrenförmigen Hohlraum. Enge Verbindungen zwischen den ein-  
zelnen Endothelzellen und mit den Endothelzellen assoziierten  
anderen Zelltypen verhindern den unkontrollierten passiven  
Durchtritt einer Vielzahl von Substanzen durch diese Zell-  
schicht.

25 Zur Aufrechterhaltung seiner Funktion ist das Gehirn in hohem  
Maße auf ein konstantes inneres Milieu angewiesen, das durch  
die Blut-Hirn-Schranke gewährleistet wird. Diese reguliert  
auch den Stoffaustausch zwischen Blut und Gehirn. Spezifische  
Transportsysteme vermitteln diesen Austausch. Die Ausbildung

dieser Barriere in den Endothelzellen der Hirnkapillaren (brain microvessel endothelial cells, BMEC) ist in der Expression spezifischer Proteine in diesem hochdifferenzierten Zelltyp im Vergleich zu anderen Endothelzellen begründet. Es sind bereits einige für die Blut-Hirn-Schranke spezifische Proteine bekannt, zum Beispiel der Glucosetransporter GLUT-1, der spezifisch für die BMEC ist und die Energieversorgung des Gehirns gewährleistet.

Aufgrund der selektiven Permeabilitätseigenschaften der Blut-Hirn-Schranke ist es schwierig, verschiedene Krankheiten des zentralen Nervensystems zu behandeln, da zahlreiche Arzneimittel die Blut-Hirn-Schranke kaum durchdringen und somit an ihrem Wirkort im Gehirn nur in geringer Konzentration ankommen. Für die Entwicklung von im Gehirn wirkenden Arzneimitteln wäre es daher von großer Bedeutung, die Funktionsweise der Blut-Hirn-Schranke und der daran beteiligten Proteine zu kennen. Insbesondere wäre es von Bedeutung, Kenntnis derjenigen Proteine zu erlangen, die gegenüber anderen Zelltypen in den Hirnkapillar-Endothelzellen in besonders hohem oder besonders geringem Maße oder aus bestimmten Spleißvarianten hergestellt werden bzw. spezifische posttranskriptionale Modifikationen aufweisen.

Die Untersuchung von Hirnkapillar-Endothelzellen ist mit verschiedenen Problemen verbunden. Zum einen steht insbesondere zur Untersuchung der Proteinexpression im menschlichen Gehirn nicht genügend Hirnmaterial zur Verfügung, wobei unter anderem auch ethische Gründe eine Rolle spielen. Ferner sind die einzelnen Individuen, von denen die Hirnmasse abstammt, in der Regel sehr verschieden im Hinblick auf ihre genetische Information. Unterschiede ergeben sich beispielsweise bzgl. Alter, Geschlecht, Gewicht, Rasse etc. Ferner muss das Untersuchungsmaterial innerhalb der ersten Stunden nach Eintritt

des Todes entnommen werden, denn nach diesem Zeitraum findet bereits eine erhebliche Veränderung der Protein Zusammensetzung in den Zellen durch enzymatische Ab- und Umbauvorgänge statt. Bisherige Verfahren zur Untersuchung der Proteinexpression in Hirnkapillar-Endothelzellen sind überdies mit dem Problem behaftet, dass das Untersuchungsmaterial nicht in ausreichender Reinheit für direkte Untersuchungen gewonnen werden kann. Bei der Isolierung von Hirnkapillar-Endothelzellen nach dem bekannten Verfahren erhält man üblicherweise ein Gemisch mit anderen Zelltypen, so dass Untersuchungen des Proteinexpressionsmusters an diesen Proben keine ausreichende Zuordnung ausschließlich zu den Hirnkapillar-Endothelzellen erlauben.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem BHS-spezifische Proteine oder Fragmente davon eindeutig identifiziert werden können. Das Verfahren soll sich insbesondere zur Identifizierung BHS-spezifischer Proteine bzw. Gene in Hirnkapillar-Endothelzellen eignen. Weiterhin soll das Verfahren einfach und schonend durchführbar sein. Ferner soll das erfindungsgemäße Verfahren selektiv für Proteine oder Fragmente davon sein, die verstärkt oder ausschließlich in Hirnkapillar-Endothelzellen gebildet werden und nicht in einem Vergleichsgewebe bzw. verwandten Zelltyp.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Identifizierung der Anwesenheit eines BHS-spezifischen Proteins oder Fragments davon in Hirnkapillar-Endothelzellen, dadurch gekennzeichnet, dass man a) frisch aus dem Gehirn isolierte Hirnkapillar-Endothelzellen durch enzymatischen Aufschluss in üblicher Weise vorreinigt, b) den in Stufe a) erhaltenen Aufschluss mit einem Lysepuffer behandelt, der vorhandene Erythrozyten und apoptotische Zellen im Wesentlichen zerstört und wenigstens 70% der Hirnkapillar-

Endothelzellen in vitaler Form erhält, c) gegebenenfalls das in Stufe b) erhaltene Produkt weiter aufreinigt, d) eine subtraktive cDNA-Bank aus den Hirnkapillar-Endothelzellen und einem Subtraktionsgewebe herstellt, e) eine cDNA-Subtraktion 5 mittels eines oder mehrerer differentieller Hybridisierungsschritte durchführt, f) Klone aus der subtraktiven cDNA-Bank durch differentielle Hybridisierung hinsichtlich ihrer jeweiligen Expression verifiziert, g) zu den BHS-spezifischen 10 Klonen aus der subtraktiven cDNA-Bank die cDNA-Sequenz ergänzt und h) das Expressionsmuster der untersuchten Klone zwischen frischen und kultivierten Hirnkapillar-Endothelzellen vergleicht und so die Anwesenheit BHS-spezifischer Proteine oder 15 Fragmente davon identifiziert.

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung 20 der Anwesenheit eines BHS-spezifischen Proteins oder Fragments davon in Hirnkapillar-Endothelzellen, dadurch gekennzeichnet, dass man a) frisch aus dem Gehirn isolierte Hirnkapillar-Endothelzellen durch enzymatischen Aufschluss in 25 üblicher Weise vorreinigt, b) den in Stufe a) erhaltenen Aufschluss mit einem Lysepuffer behandelt, der vorhandene Erythrozyten und apoptotische Zellen im Wesentlichen zerstört und wenigstens 70% der Hirnkapillar-Endothelzellen in vitaler Form erhält, c) gegebenenfalls das in Stufe b) erhaltene Produkt weiter aufreinigt, d) das in Stufe c) erhaltene Produkt in einem geeigneten Puffer solubilisiert, e) eine isoelektrische Fokussierung durchführt, f) die Proben aus der 30 isoelektrischen Fokussierung in der zweiten Dimension nach Molekulargewicht auftrennt, g) differentielle Spots identifiziert und isoliert, h) mit dem Isolat von g) eine massenspektrometrische Analyse durchführt, und i) hiervon eine Auswertung mittels gezielter Datenbankanalyse vornimmt.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich BHS-spezifische Proteine oder Fragmente davon eindeutig und zuverlässig identifizieren und die Erfindung betrifft auch die mit diesem Verfahren isolierten Proteine sowie die diese Proteine kodierenden Transkripte bzw. Gene. Insbesondere betrifft die Erfindung auch die nach diesem Verfahren isolierten Proteine mit den Sequenzen SEQ ID NO: 5, 14, 19, 23, 27, 33.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass die Kombination der vorstehend genannten Verfahrensschritte die eindeutige Identifizierung BHS-spezifischer Proteine in Hirnkapillarendothelzellen erlaubt. Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren isolierten Proteine sind für die BHS spezifisch. Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren isolierten Proteine besitzen aufgrund ihrer Spezifität für die BHS eine Funktion in bzw. an der BHS. Bei dieser Funktion kann es sich beispielsweise um eine Barrierefunktion, eine Transportfunktion, eine Funktion im Zusammenhang mit der Nährstoffversorgung der BHS, eine Funktion als Tight-Junction-Protein, eine enzymatische Aktivität etc. handeln. Somit ist es möglich, ausgehend von der Identifizierung der Anwesenheit dieser Proteine gezielt spezifische Funktionen davon in der BHS abzuleiten. Dies eröffnet die Möglichkeit gänzlich neuer Therapiekonzepte, die darauf beruhen, dass Substanzen gezielt durch die BHS geschleust werden können. Ferner können die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Proteine gezielt Gegenstand therapeutischer Interventionen sein. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt erstmalig die Entwicklung von therapeutischen Konzepten für das Gehirn betreffende Erkrankungen. Weiterhin kann der Nachweis von Veränderungen in den nach dem beschriebenen Verfahren identifizierten Proteinen zur Diagnose von Krankheiten benutzt werden, die auf einer Dysfunktion der BHS basieren.

Von besonderer Bedeutung bei den erfindungsgemäßen Verfahren ist die Verwendung von frisch isolierten BMEC (Primärzellen) anstelle von kultivierten BMEC. Es wurde überraschenderweise gefunden, dass BMEC in Kultur sehr schnell dedifferenzieren, 5 d.h. ihre BHS-Eigenschaften sehr schnell verlieren. Ferner wurde auch gefunden, dass die Expression der für die Blut-Hirn-Schranke spezifischen Proteine in kultivierten Hirnkapillar-Endothelzellen stark herabreguliert ist und nach nur wenigen Passagen völlig verschwindet, wodurch keine zuverläss- 10 sige Isolierung und Identifizierung BMEC spezifischer Proteine möglich ist. Außerdem müssen reine und vitale Zellen isoliert werden, um Zellspezifität zu gewährleisten und negative oder das Ergebnis verfälschende Effekte durch Apoptose zu verhin- dern.

15 Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann die Entnahme von Gehirnmateriale aus dem jeweiligen Organismus durch operativen Eingriff in den lebenden Organismus erfolgen. Auf diese Weise können beispielsweise auch Hirnproben vom menschlichen Organismus bei Hirnoperationen erhalten werden. Vorteilhafter ist 20 jedoch die Entnahme des vollständigen Gehirns oder von Teilen davon aus dem Organismus möglichst unmittelbar nach Eintritt des Todes. Bevorzugt wird das Gehirn in einem Zeitraum von höchstens einer Stunde, bevorzugter etwa höchstens 30 Minuten, noch bevorzugter etwa höchstens 15 Minuten oder noch weiter 25 bevorzugter etwa 5 Minuten nach Eintritt des Todes entnommen. Das Gehirn kann beliebigen Lebewesen entnommen werden, beispielsweise dem Menschen, Rindern, Schafen, Ziegen, Pferden etc. Es wurde nun gefunden, dass Schweinehirne ein gutes Modell für das menschliche Gehirn im Hinblick auf die Untersu- 30 chung der Hirnkapillar-Endothelzellen auf BHS-spezifische Proteine sowie der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen darstellen.

Das Schweinehirn ist zum menschlichen Gehirn sowohl bezüglich der Anatomie als auch der Morphologie sehr ähnlich. Ferner sind generell Sequenzhomologien zwischen Mensch und Schwein sowohl auf Protein- als auch auf Nukleinsäureebene sehr hoch, 5 so dass sich an Schweinematerial erhaltene Ergebnisse zuverlässig auf den Menschen übertragen lassen und umgekehrt. Dies ist darin begründet, dass Mensch und Schwein phylogenetisch näher verwandt sind als Mensch und klassische Modellorganismen wie Maus oder Ratte.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass ein hyptonischer Lysepuffer nicht nur Erythrozyten lysiert, sondern auch allgemein tote und apoptotische Zellen durch hypotonischen Schock platzen lässt. Der bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zu verwendende Lysepuffer erhält wenigstens 70 %, bevorzugt 80 %, 15 bevorzugter 90 %, noch bevorzugter 95 % der Hirnkapillar-Endothelzellen in vitaler Form. Ferner muss der Lysepuffer ungiftig sein und einen pH-Wert im physiologischen Bereich besitzen. Der erfindungsgemäß verwendete hypotonische Puffer sollte eine Ionenstärke von 0,1-0,2 M besitzen, ein- und 20 zweiseitige Anionen bzw. Kationen enthalten und in einem pH-Bereich von 7,0-8,0 puffern. Alle enthaltenen Substanzen müssen ungiftig für die Zellen sein, so dass gesunde Zellen in dem Puffer für kurze Zeit nicht geschädigt werden. Bevorzugt enthält der hypotonische Puffer mit einer Ionenstärke von 0,1- 25 0,2 M Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Calcium-, Magnesium-, Chlorid- und Sulfat-Ionen sowie Glukose und puffern in einem pH-Bereich von 7,0-8,0. Dies erlaubt eine selektive Anreicherung vitaler Hirnkapillar-Endothelzellen aus einem Gemisch von Erythrozyten und anderen Zellen variierender Vitalität. Der erfindungsgemäß verwendete Puffer besitzt bevorzugt die folgende Zusammensetzung bei einem pH-Wert von 7,5:

Ion/Substanz	min. Konz. [mM]	max. Konz. [mM]
Na <sup>+</sup>	30,0	60,0
K <sup>+</sup>	5,0	7,5
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	80,0	100,0
Ca <sup>2+</sup>	1,0	2,0
Mg <sup>2+</sup>	6,0	9,0
Cl <sup>-</sup>	125,0	175,0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,5	6,5
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0,5	2,5
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,3	0,6
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,4	0,7
Glukose	1,5	3,0

Bevorzugter besitzt der eingesetzte Lysepuffer die folgende Zusammensetzung:

NaCl	30 mM	bis	50 mM
KCl	4,5 mM	bis	5,5 mM
NH <sub>4</sub> Cl	80 mM	bis	100 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,0 mM	bis	2,0 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,6 mM	bis	0,8 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,3 mM	bis	0,6 mM

NaHCO <sub>3</sub>	4,5 mM	bis	6,5 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 mM	bis	0,45 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4 mM	bis	0,65 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 mM	bis	0,15 mM
Glucose	1,5 mM	bis	3,0 mM

Besonders bevorzugt besitzt der Puffer die folgende Zusammensetzung:

NaCl	39 mM
KCl	5,1 mM
NH <sub>4</sub> Cl	88 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,6 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,69 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,46 mM
NaHCO <sub>3</sub>	5,6 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,33 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,53 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,12 mM
Glucose	2,24 mM

Normalerweise werden derartige Lysepuffer zur Isolierung von Lymphozyten bzw. von RNA aus Lymphozyten eingesetzt, indem hierbei zuerst die Erythrozyten lysiert werden. Weder die Zusammensetzung des erfindungsgemäß verwendeten Puffers noch 10 die Anwendung eines derartigen Puffers zur Lyse apoptotischer Zellen wurde bisher beschrieben.

Die selektive Lyse apoptotischer Zellen ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren von wesentlicher Bedeutung, um BHS-spezifische Transkripte anzureichern ohne dabei gleichzeitig Transkripte von Genen anzureichern, die verstärkt während der 5 Apoptose exprimiert werden. Bei anderen Verfahren zur Isolierung von Zellen wird das Problem der Apoptose dadurch umgangen, indem die isolierten Zellen in Kultur genommen werden. Hirnkapillar-Endothelzellen verändern jedoch in Kultur ihre 10 Eigenschaften, was zu einem veränderten Genexpressionsmuster führt. Somit erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren zur Zellpräparation durch den abschließenden Lyseschritt erstmalig und 15 gezielt die Isolierung ausreichender Mengen an frischen Hirnkapillar-Endothelzellen.

Nach Entnahme des Gehirns aus dem Organismus wird dieses 15 zweckmäßigerweise in einen geeigneten Puffer überführt und auf Eis gekühlt schnellstmöglich zur weiteren Verarbeitung ins Labor transportiert. Die zu isolierenden Hirnkapillar-Endothelzellen befinden sich im Wesentlichen in der grauen Hirnsubstanz. Vor der weiteren Aufreinigung der Zellen wird 20 daher bevorzugt die graue Hirnsubstanz mechanisch aus den übrigen Hirnteilen herauspräpariert. Hierfür wird zunächst die Hirnhaut abgezogen und die graue Hirnsubstanz abgeschabt, zerkleinert und in ein geeignetes Medium überführt. Ein geeignetes Medium ist z.B. M199-Medium (Gibco/BRL, Grand Island, 25 NY) oder Earle's Puffer. Vor der weiteren Aufreinigung ist es zweckmäßig, die Masse der erhaltenen grauen Hirnsubstanz zu bestimmen.

Earle's Puffer: NaCl	117,2 mM
(pH 7,3) KCl	5,3 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,0 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,81 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,8 mM
Glucose x H <sub>2</sub> O	5,6 mM

Erfindungsgemäß erfolgt die Vorreinigung der Hirnkapillar-  
Endothelzellen durch Aufschließen der Hirnsubstanz in wenig-  
stens zwei aufeinander folgenden enzymatischen Schritten. In  
5 einem ersten enzymatischen Schritt wird die Hirnsubstanz mit  
dem Enzym Dispase verdaut. Der Dispaseverdau bewirkt die  
Auflösung des Nervengewebes. Als besonders geeignet hat sich  
eine Menge von 5 mg Dispase pro Gramm graue Hirnsubstanz  
erwiesen. Der Dispaseverdau erfolgt zweckmäßigerweise in M199-  
10 Medium, es sind jedoch auch andere Medien und Puffer für diese  
Reaktion geeignet. Eine entsprechend vorbereitete Dispaselö-  
sung wird zur Probe der grauen Hirnsubstanz gegeben, und die  
Suspension unter Rühren bei 37° inkubiert. Inkubationszeiten  
von zwei bis vier Stunden, vorzugsweise etwa drei Stunden,  
15 haben sich als besonders vorteilhaft erwiesen. Die Enzymkon-  
zentrationen, die verwendeten Lösungsmittel bzw. Medien und  
die Inkubationsdauer sind jeweils so auszuwählen, dass mög-  
lichst viel des Materials abgebaut bzw. aufgelöst wird, wel-  
ches die Hirnkapillaren umgibt bzw. bindet. Gleichzeitig sind  
20 die Bedingungen jedoch so einzustellen, dass ein möglichst  
geringer Teil der zu isolierenden Hirnkapillar-Endothelzellen  
bei dem jeweiligen enzymatischen Schritt angegriffen bzw.  
abgetötet wird und die Zellen einer möglichst geringen Belas-  
tung ausgesetzt werden.

Wesentlich ist hierbei, dass entstehende Scherkräfte möglichst gering gehalten werden. Dies wird beispielsweise dadurch erzielt, dass der enzymatische Verdau der Hirnmasse in Spinerflaschen langsam und kontinuierlich gemischt wird.

- 5 Nach dem Dispaseverdau werden in einer erster Reinigungsstufe die Hirnkapillaren mittels Zentrifugation in Dextranlösung gewonnen. Hierfür können aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren eingesetzt werden. Als besonders geeignet hat sich erwiesen, eine Menge der Zellsuspension aus dem Dispaseverdau mit der gleichen Menge einer 15%igen Dextranlösung zu mischen, 10 min. zu schütteln und für etwa zehn Minuten bei 10°C bei 8650 x g in einem Festwinkelrotor zu zentrifugieren. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und das Sediment dem zweiten enzymatischen Schritt zugeführt.
- 15 Im zweiten enzymatischen Schritt wird das Sediment der Zentrifugation mit Collagenase D verdaut. Collagenase D löst unter anderem die Basalmembran auf. Dem zweiten enzymatischen Schritt werden zweckmäßigerweise ein oder mehrere Proteaseinhibitoren zugegeben. Besonders geeignet ist hierfür der Proteaseinhibitor Na-p-Tosyl-L-Lysin-Chloromethylketon (TLCK). 20 Der zweite enzymatische Schritt wird zweckmäßigerweise unter Rühren bei 37°C für etwa eine Stunde durchgeführt. Es hat sich auch als besonders geeignet erwiesen, im zweiten enzymatischen Schritt eine oder mehrere DNAsen, wie Benzonase, einzusetzen.
- 25 Hierdurch wird die beim Aufschluss toter Zellen frei werdende DNA abgebaut, welche ansonsten die Viskosität der Suspension erhöht.

Nach dem zweiten enzymatischen Schritt wird eine zweite Reinigungsstufe mittels Zentrifugation im Percoll-Dichtegradienten 30 durchgeführt. Der Dichtegradient wird vorbereitet, indem man beispielsweise 9,91 ml Percoll, 0,72 ml 10-fach konzentriertes

M199-Medium und 19,37 ml Earle's Puffer mischt und in der Ultra-Zentrifuge bei 37200 x g, 4°C im Festwinkelrotor für eine Stunde zentrifugiert. Die Zellsuspension aus dem zweiten enzymatischen Schritt wird durch mehrfaches Zentrifugieren bei 5 geringer Geschwindigkeit, Abziehen des Überstandes und Resuspendieren des Zentrifugationssediments gewaschen, d.h. von den zugesetzten Enzymen befreit. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird das Sediment in einer geringen Menge Flüssigkeit, wie z.B. 6 ml M199-Medium, aufgenommen und auf den 10 vorbereiteten Percoll-Dichthegradienten aufgetragen und in der Ultrazentrifuge bei 1400 x g, 4°C für zehn Minuten im Ausschwingrotor zentrifugiert. Die Percoll-Dichthegradientenzentrifugation bewirkt eine Auftrennung des 15 suspendierten Zellmaterials nach seiner Dichte, wobei üblicherweise drei diskrete Banden auftreten. Eine erste obere Bande mit der geringsten Dichte enthält Zelltrümmer bzw. Zellfragmente. Eine zweite mittlere Bande enthält unter anderem die zu isolierenden Hirnkapillar-Endothelzellen. In einer dritten unteren Bande mit der höchsten Dichte sammeln sich 20 unter anderem Erythrozyten.

Die zweite Bande, welche die Hirnkapillar-Endothelzellen enthält, wird isoliert und erfindungsgemäß einer weiteren Reinigung zugeführt. Die Isolierung kann durch Abziehen der Bande mit Hilfe einer Kanüle oder vorzugsweise durch Abpipettieren erfolgen. 25

Neben den Hirnkapillar-Endothelzellen enthält das Material der aus der Percoll-Dichthegradientenzentrifugation erhaltenen zweiten Bande noch eine Vielzahl anderer Zelltypen, im Wesentlichen Erythrozyten und apoptotische Zellen. Bislang war es 30 nicht möglich, diese verunreinigenden Zellen in ausreichendem Maße von den Hirnkapillar-Endothelzellen unter schonenden Bedingungen zu trennen. Überraschenderweise wurde nun gefun-

den, dass dieses Problem gelöst werden kann, wenn die weitere Reinigung der Hirnkapillar-Endothelzellen mit einem Lysepuffer durchgeführt wird, wie er üblicherweise zur Isolierung von Lymphozyten verwendet wird, wobei die Zusammensetzung des 5 Lysepuffers, die Behandlungsdauer und die Behandlungstemperatur so ausgewählt sind, dass vorhandene Erythrozyten und apoptotische Zellen im Wesentlichen vollständig zerstört werden und ein Großteil der Hirnkapillar-Endothelzellen überlebt. Die Vorteile und Eigenschaften dieses Puffers wurden 10 vorstehend dargelegt.

Als erfindungsgemäß geeignet hat sich ein Lysepuffer erwiesen, der die folgenden Bestandteile enthält:

NaCl	30 mM	bis	50 mM
KCl	4,5 mM	bis	5,5 mM
NH <sub>4</sub> Cl	80 mM	bis	100 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,0 mM	bis	2,0 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,6 mM	bis	0,8 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,3 mM	bis	0,6 mM
NaHCO <sub>3</sub>	4,5 mM	bis	6,5 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 mM	bis	0,45 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4 mM	bis	0,65 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 mM	bis	0,15 mM
Glucose	1,5 mM	bis	3,0 mM

15 Besonders geeignet ist ein Lysepuffer, der die folgende Zusammensetzung hat:

NaCl	39 mM
KCl	5,1 mM
NH <sub>4</sub> Cl	88 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,6 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,69 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,46 mM
NaHCO <sub>3</sub>	5,6 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,33 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,53 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,12 mM
Glucose	2,24 mM

Nach Zugabe des Lysepuffers wird die Suspension gemischt und mehrfach durch Zentrifugieren bei niedriger Geschwindigkeit und Resuspension in geeignetem Medium bzw. Puffer, wie M199 oder Earle's Puffer, gewaschen. Im Zentrifugat sammeln sich die gereinigten Hirnkapillar-Endothelzellen.

Die gereinigten Hirnkapillar-Endothelzellen können nun auf zwei verschiedenen Wegen weiter verarbeitet werden um die Anwesenheit BHS-spezifischer Proteine oder Fragmente davon zu identifizieren. So können zum einen über den Proteomics-Ansatz als auch über den Genomics-Ansatz jeweils unterschiedliche Proteine bzw. Fragmente davon bzw. Transkripte identifiziert und isoliert werden. Nachstehend werden beide Ansätze näher beschrieben.

Die folgenden Figuren erläutern den Gegenstand der vorliegenden Erfindung näher:

Figur 1: Northern-Blot Analyse von Itm2A

Figur 2: Expressionsmuster von Itm2A in kultivierten BMEC  
(M:100 bp-Marker)

Figur 3: Expressionsmuster von S231 (M:100 bp ladder)

Figur 4: Expressionsmuster von ssEMP1 (M:100 bp ladder)

5 Figur 5: Northern-Blot Analyse hybridisiert mit S231 (A) bzw.  
EMP1 (B) als Sonde

Figur 6: Homologie-Vergleich von humanem und murinem EMP1  
sowie porcinem S231. Die Membrandomäne ist hell her-  
vorgehoben, die N-Glykosilierungsstelle hellgrau.

10 Figur 7: Expressionsmuster von S231 in kultivierten Zellen  
(M:100 bp-Marker)

Figur 8: Northern-Blot hybridisiert mit full-length  
FLJ13448/S012 als Sonde

15 Figur 9: Homologie-Vergleich von humanem, murinem und porci-  
nem FLJ13448/S012. Kursiv sind jeweils die Peptide  
dargestellt, die als Signalpeptide dienen und ab-  
gespalten werden.

Figur 10: Expressionsmuster von porcinem FLJ13448/S012 in  
kultivierten Zellen (M:100 bp-Marker)

20 Figur 11: NSE2 Aminosäuresequenz des humanen Proteins. Durch  
die fette, unterstrichene Schrift sind die im Mas-  
senfingerprint identifizierten Peptide gekennzeich-  
net.

25 Figur 12: Northern-Blot für NSE2 hybridisiert mit SEQ ID NO:  
22 als Sonde

Figur 13: Expressionsmuster von NSE2 in kultivierten Zellen  
(M:100 bp-Marker),

5 Figur 14: Homologie-Vergleich von humanem NSE2 und NSE1. In hellem Font sind potentielle Phosphorilierungsstellen dargestellt. Unterstrichen ist eine mögliche Tyrosin-Kinase Domäne (ProSite Pattern Match PS00109), wobei der aktive Rest fett dargestellt ist.

10

Figur 15: Verteilung von PEST-Domänen in NSE2. PEST-Sequenzen sind Pro, Glu, Ser und Thr reiche Regionen in Proteinen, die für eine kurze Halbwertszeit solcher Proteine in der Zelle verantwortlich sind, indem sie die Ubiquitinierung dieser Proteine kontrollieren. Phosphorilierung bestimmter Ser oder Thr Reste in den PEST-Regionen (hell) ist für die Erkennung und Prozessierung durch den Ubiquitin-Proteasom Weg wichtig.

15 Figur 16: Aminosäuresequenz des humanen Proteins DRG-1 (CAB66619). Durch die fette, unterstrichene Schrift sind die im Massenfingerprint identifizierten Peptide gekennzeichnet.

20 Figur 17: Der Homologie-Vergleich von humanem und murinem DRG-1 zeigt 90 % Identität bzw. 94 % Homologie. Potentielle Phosphorilierungsstellen, eine nicht konserveierte potentielle Glykosilierungsstelle und die Transmembrandomäne sind in hellem Font dargestellt. Der N-Terminus ist intrazellulär lokalisiert.

25 Figur 18: Expressionsmuster von DRG-1 (M:100 bp-Marker)

Figur 19: Expressionsmuster von DRG-1 in kultivierten Zellen (M:100 bp-Marker)

Figur 20: TKA-1 Aminosäuresequenz des humanen Proteins. Durch die fette, unterstrichene Schrift sind die im Mas-

senfingerprint identifizierten Peptide gekennzeichnet.

Figur 21: Northern-Blot hybridisiert mit ssTKA-1.ctg als Sonde

Figur 22: Expressionsmuster von TKA-1 in kultivierten Zellen  
5 (M:100 bp-Marker)

**Identifizierung BHS-spezifischer Proteine durch differentielle  
2D-Gelelektrophorese**

Durch den direkten zweidimensionalen Vergleich der Genprodukte kann ein vollständiges Bild der Hirnkapillar-Endothelzellen erhalten werden. Erfindungsgemäß wird bei allen Elektrophoresen ein Vergleichsgewebe verwendet. Das Vergleichsgewebe ist ein Gewebe, das eine gezielte Identifikation von Transkripten bzw. Proteinen erlaubt, die spezifisch für die Blut-Hirn-Schranke sind. Grundsätzlich können beliebige Endothelzellen 15 als Vergleichsgewebe verwendet werden, beispielsweise makro- und mikrovaskuläre Endothelzellen des gleichen Gewebes oder auch Endothelzellen aus anderen Organen, z.B. Herz, Lunge, Niere, Leber, Aorta etc. Es können auch aus Kultur gewonnene dedifferenzierte BMEC verwendet werden. Es ist jedoch bevorzugt, einen anderen Endothelzelltyp als Vergleichsgewebe gegen Hirnkapillar-Endothelzellen zu verwenden. Bevorzugt werden Endothelzellen aus Aorta verwendet, die keine Barrierefunktion aufweisen. Dies hat zusätzlich den Vorteil, dass Mikrogefäß 25 gegen Makrogefäß verglichen werden können. Es können ferner auch andere mikrovaskuläre Endothelzellen benutzt werden. Ebenfalls geeignet sind unter anderen Bedingungen kultivierte Hirnkapillar-Endothelzellen als Vergleichsgewebe, z.B. unter anderen Bedingungen bzgl. pH-Wert, Wachstumsmatrix, Wachstumsfaktoren, z.B. Cytokine. Aus den bekannten Eigenschaften der 30 Hirnkapillar-Endothelzellen gegenüber dem jeweiligen Vergleichsgewebe ergibt sich die physiologische Bedeutung der

identifizierten Proteine. Erfindungsgemäß bevorzugt werden zwei definierte Zelltypen verwendet: Frisch isolierte BMEC als der Zelltyp mit Schrankenfunktion und Endothelzellen aus Aorta, die also wie BMEC auch Endothelzellen sind, jedoch 5 keine Schrankenfunktion aufweisen. Insbesondere durch die Verwendung von Schweinegewebe ist es erstmals möglich eine so detaillierte Proteomkarte dieser Zellen zu erstellen.

### Probenvorbereitung

Zunächst ist die Vitalität der präparierten Zellen und der Anteil der in der Präparation enthaltenen Erythrozyten zu bestimmen. Zur Bestimmung der Vitalität werden 20 µl der suspenzierten Zellen entnommen und mit 4 µl Fluorescindiacetat-Arbeitslösung (24 µM in Earle's Puffer) und 2 µl Propidium-iodid-Arbeitslösung (70 µM in Earle's Puffer) versetzt. Die 15 Suspension wird gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden unter einem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert und das Verhältnis vitale zu geschädigten Zellen bestimmt. Lebende Zellen sind an einer grünen Fluoreszenz (Exitation 450 nm und Emission 515 nm), geschädigte Zellen dagegen an einer 20 roten im Kern lokalisierten Fluoreszenz (Exitation 488 nm und Emission 615 nm) zu erkennen. Der Anteil der Erythrozyten wird durch Zugabe von 20 µl Benzidin-Arbeitslösung (15 mM Benzidin-hydrochlorid, 12 % (v/v) Essigsäure, 2 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zu 20 µl Zellsuspension bestimmt. Die Probe wird gemischt und 5 min bei 25°C inkubiert. Danach wurde ein Tropfen der Zellen auf einen 25 Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Erythrozyten erscheinen in diesem Test durch die Anlagerung blauer Kristalle im Durchlichtmikroskop. Durch Auszählen wird das Verhältnis von Endothelzellen zu Erythrozyten bestimmt. 30 Die Zellen lassen sich bei einem Vitalitätsverhältnis von 95 % vitaler Zellen und bei einer Erythrozytenverunreinigung von

unter 10 % für die nachfolgende zweidimensionale Gelektrophorese verwenden.

Das Feuchtgewicht der frisch isolierten, sedimentierten Zellen wird bestimmt und mit dem fünffachen Volumen (z.B. 100 mg 5 Zellen mit 500 µl Puffer) Puffer A pH 6.8 (10 mM PIPES, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM Saccharose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 150 µM Digitonin) vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde danach 20 min unter leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation (480 g, 4°C, 10 min), um die Zellen zu sedimentieren. Der Überstand wird abgezogen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Das Sediment wird dann wiederum im fünffachen Volumen des 15 ursprünglichen Feuchtgewichtes in Puffer B pH 7.4 (10 mM PIPES, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM Saccharose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5% (v/v) Triton X-100) resuspendiert und auf Eis 30 min unter heftigem Schütteln inkubiert. Danach wird die Probe 10 min durch Zentrifugation (5000 g, 4°C) sedimentiert, der Überstand abgezogen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

20 Das Sediment wird nun im 1,7fachen des ursprünglichen Feuchtgewichtes in Puffer C pH 7.4 (10 mM PIPES, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 1% (v/v) TWEEN-40, 0,5% (w/v) Desoxycholat) resuspendiert, in einen Dounce-Homogenisator überführt und mit fünf Hüben aufgeschlossen. Danach wird die Probe wieder in ein 25 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 min im Ultraschallbad inkubiert. Die Probe wird dann durch Zentrifugation (6780g, 4°C, 10 min) sedimentiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

30 Das Sediment ist je nach Größe in 200 - 500 µl Puffer D pH 8.0 (50 mM Tris, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) zu resuspendieren und wird in Stickstoff schockgefroren. Danach wird die Probe im Ultraschallbad

aufgetaut und anschließend bei 37°C mit 5 - 10 µl Benzonase (25 U/µl) inkubiert bis sich eine homogene, nicht mehr viskose Flüssigkeit bildet. Dann wird das 7fache Volumen einer 5 % (w/v) SDS-Lösung zugegeben und die Probe 20 min auf 90°C erhitzt. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min (7000g, 20°C) zur Entfernung unlöslicher Bestandteile. Der Überstand wurde abgezogen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Das eventuell vorhandene Sediment wird verworfen.

Die Überstände werden aufgetaut, anteilmäßig vereinigt und gemischt. Um die in der Probe enthaltenen Detergenzien zu entfernen, erfolgt die Mischung der Probe mit 100 % Aceton (gelagert bei -30°C) im Verhältnis 20 zu 80. Nach gründlichem Mischen wird die Fällung mindestens 1 h bei -30°C inkubiert. Danach erfolgt die Sedimentierung der gefällten Proteine für 15 min bei 10.000g und 4°C. Der Überstand wird dekantiert und verworfen.

Anschließend wird das Sediment mit 80 % (v/v) Aceton (-30°C kalt) gewaschen und erneut bei -30°C inkubiert. Nach der erneuten Zentrifugation (15 min, 10.000 g, 4°C) wird der Überstand verworfen und das Sediment in der kleinstmöglichen Menge Solubilisierungspuffer I (7 M Harnstoff, 2 M Thiocarbamstoff, 4 % (w/v) CHAPS) oder II (8 M Harnstoff, 4 % (w/v) CHAPS) resuspendiert und der Proteingehalt der Proben bestimmt. Dazu werden für die Proteinbestimmung in einem 50 ml Reaktionsgefäß 1 Teil Rotiquant (Roth) und 4 Teile bidestilliertes Wasser zu einer fertigen Arbeitslösung gemischt und unlösliche Bestandteile über einen Faltenfilter entfernt. Für die Eichgerade werden Verdünnungen von Rinderserumalbumin (BSA) in Solubilisierungspuffer I bzw. II hergestellt. Dabei wurden für die Eichlösungen Konzentrationen von 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1,0 mg/ml eingestellt. Von den Eichlösungen, der Probe und der Referenz (Solubilisierungspuf-

fer I oder II) werden je 20  $\mu$ l in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 1 ml der Rotiquant-Arbeitslösung versetzt. Gemischt wird in dem jeweiligen Reaktionsgefäß durch sofortiges Invertieren, danach erfolgt eine Inkubation der Probe bei 5 25°C für die Dauer von 20 min. Nach Überführen der Probe in eine 1 ml Küvette wird in einem Spektralphotometer bei 560 nm die Absorption gemessen. Durch Erstellung einer Eichgerade kann der Proteingehalt der Proben bestimmt werden.

10 Die restlichen Überstände der Proben werden dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### Isoelektrische Fokussierung

Für 12 Fokussierungsgelle werden 2,5 mg Probe, die in 4,5 ml Solubilisierungspuffer I oder II (für pH-Gradient 4,5-5,5) gelöst vorliegen, mit 1,125 ml Fokussierungspuffer I (7 M 15 Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% (w/v) CHAPS, 91 mM DTT, 2,5 % IPG-Puffer) bzw. II (8 M Harnstoff, 4% (w/v) CHAPS, 91 mM, 2,5% IPG-Puffer; für pH-Gradient 4,5-5,5) versetzt, 1 min im Ultraschallbad behandelt und dann 5 min in der Tischzentrifuge (20.000g) zentrifugiert. Für die verwendeten pH-Gradienten 20 (3,5 - 4,5; 4,0 - 5,0; 4,5 - 5,5; 5,0 - 6,0; 5,5 - 6,7; 6,0 - ,0) die als 24 cm lange Gele (Immobiline DryStrip; Amersham Biosciences) eingesetzt werden, werden die passenden IPG-Puffer eingesetzt.

Anschließend werden je 450  $\mu$ l Probe in die Rehydratisierungs- 25 vorrichtung pipettiert und das Immobiline DryStrip-Fokussierungsgel mit Hilfe von zwei Pinzetten mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei auf die Lösung gelegt. Danach wird das Gel mit Paraffinöl überschichtet. Die Rehydratisierungs- dauer beträgt mindestens 12 h bis maximal 16 h. Beim pH- 30 Gradienten 6,0 - 9,0, bei dem die Probe mittels Cup-Loading aufgetragen wird, wird anstelle der Probe mit der entsprechen-

den Mischung aus Solubilisierungspuffer I (4,5 ml) mit dem entsprechenden Fokussierungspuffer I (1,125 ml) der Gelstreifen rehydratisiert. Nach der Rehydratisierung wird jeder Gelstreifen in einen 24 cm Stripholder überführt und in Falle 5 des „Cup Loadings“ zusätzlich der Sample Cup direkt vor die Kathode platziert. Die Probe mit jeweils 200 µg Protein wird in den Sample Cup pipettiert und zusammen mit dem Immobiline DryStrip-Gel mit Paraffinöl überschichtet.

Die mit bidestilliertem Wasser angefeuchteten Elektrodenstreifen werden an den jeweiligen Gelenden positioniert. Auf diese Streifen werden dann die Elektroden aufgesetzt. Danach werden jeweils 6 beladene Stripholder in einer ETTAN IPGphor Fokussierungsapparatur (Amersham Biosciences) mit einem, dem pH-Gradienten entsprechenden Programm (siehe Tabelle 1) fokussiert. Nach Abschluss der Fokussierung werden die Streifen mit einer Pinzette entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei - 15 80°C gelagert.

Tabelle 1: Programme für die Isoelektrische Fokussierung

Programm 1			
S1	500 V	Linearer Gradient	1 h
S2	500 V	Stufengradient	1 h
S3	1000 V	Stufengradient	1 h
S4	8000 V	Linearer Gradient	1 h
S5	8000 V	Stufengradient	88 kWh
Programm 2			
S1	500 V	Linearer Gradient	0,5 h

S2	500 V	Stufengradient	0,5 h
S3	1000 V	Linearer Gradient	0,5 h
S4	1000 V	Stufengradient	0,5 h
S5	4000 V	Linearer Gradient	1,0 h
S6	4000 V	Stufengradient	0,5 h
S7	8000 V	Linearer Gradient	0,5 h
S8	8000 V	Stufengradient	105 kWh

Programm 1 wird für die pH-Gradienten 3,5 - 4,5, 4,0 - 5,0, 4,5 - 5,5, 5,0 - 6,0 und 5,5 - 6,7 angewandt, während Programm 2 bei Gelen mit einem pH-Gradienten von 6,0 - 9,0 zur Anwendung kommt.

#### SDS-Gelelektrophorese

Für die zweite Dimension werden die benötigten SDS-Polyacrylamidgele mit einer Konzentration an Acrylamid von 2,5 % (w/v) selbst hergestellt.

10 Die Gelgießapparatur wird entsprechend der Bedienungsanleitung (Amersham Biosciences) montiert und mit Verdrängungspuffer pH 8,8 (0,375 M Tris, 50 % (v/v) Glycerin, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau) in das vorgesehene Reservoir gefüllt.

15 Der Gelpolymerisationsansatz pH 8,8 (12,17 % (w/v) Acrylamid, 0,33 % (w/v) Bisacrylamid, 0,375 M Tris, 0,1 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat) wird in ein Gefäß mit Auslaufstülle gemischt und dann 5 min im Ultraschallbad entgast. Danach wird die Polymerisationsreaktion durch Zugabe von 0,04

% (v/v) TEMED gestartet. Sofort wird das Gefäß an einem Stativ montiert und über einen Schlauch mit der Gelgießapparatur verbunden. Die Gellösung wird in die Apparatur fließen lassen bis sie ca 3 cm unter der niedrigeren Kante der Gel-Kassetten 5 steht. Danach wird der Stopfen des Reservoirs für den Verdrängungspuffer gelöst und der Puffer verdrängt die Gellösung, bis diese ca 1 cm unter die Glaskante der Kasette gestiegen ist. Die gegossenen Gele werden bis zur vollständigen Polymerisation mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet.

10 Je ein Fokussierungsgel wird aus dem - 80°C-Gefrierschrank entnommen und in ein Equilibrierungsröhrchen überführt. Durch Zugabe von je 15 ml Reduktionspuffer pH 8.8 (6 M Harnstoff, 50 mM Tris, 30% (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 65 mM DTT) werden die in den Gelen fokussierten Proteine unter Schütteln für 15 15 min bei 25°C reduziert. Danach wird der Reduktionspuffer verworfen und die Proteine durch Zugabe von 15 ml Alkylierungspuffer (6 M Harnstoff, 50 mM Tris, 30% (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 260 mM Iodacetamid) mit Iodacetamid alkyliert. Die Inkubation erfolgt dabei ebenfalls für 15 min bei 25°C unter 20 Schütteln. Der Puffer wird anschließend auch verworfen und der Gelstreifen wird aus dem Röhrchen entnommen. Mit Hilfe einer 25 Pinzette wird das Gel auf die SDS-Gele gelegt und mit 2 ml flüssiger Agaroselösung pH 8,3 (0,5 % (w/v) Agarose, 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) überschichtet und dadurch fixiert. Die Elektrophoresekammer ETTAN DALT II (Amersham Biosciences) wird mit 10 l 2D-Laufpuffer pH 8,3 (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) gefüllt, die PAA-Gele in das Gerät eingebaut und der Elektrophoreselauf durchgeführt. Dabei wird zunächst eine konstante Leistung von 5 W pro PAA-Gel für 30 50 min eingestellt. Die Temperatur beträgt konstant 20°C. Danach wird die Leistung auf 55 W pro Gel maximal jedoch auf 180 W erhöht und die Elektrophorese fortgesetzt bis der blaue

Kontrollfarbstoff (Bromphenolblau) das untere Ende der Gele erreicht hat. Die Elektrophorese wird beendet und die Gele entnommen. Je Gel werden in einer Schale 400 ml (7 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Methanol) vorgelegt, das Gel aus den 5 Glasplatten entnommen und in die Schalen überführt. Zur Fixierung werden die Gele 30 min bei 25°C unter Schütteln inkubiert. Währenddessen werden 400 ml SyproRuby Färbelösung in einer schwarzen Schale vorgelegt und die fixierten Gele nach Ablauf der Inkubationszeit in die Färbelösung überführt. Nach 10 der Färbung für 16 h unter Schütteln werden die Gele in 400 ml Fixierung 15 min entfärbt und zur Dokumentation im FLA 5000 Scanner (Fuji) bei einer Anregungswellenlänge von 473 nm und einer Emissionswellenlänge von 575 nm bei einer Auflösung von 100 µm und einer 16 bit Gradiation gescannt. Die Gele werden 15 danach in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **Identifikation differentieller Spots**

Zur Identifikation differentieller Proteinspots wurden zu-  
nächst pro pH-Gradient (3,5 - 4,5; 4,0 - 5,0; 4,5 - 5,5; 5,0 -  
20 6,0; 5,5 - 6,7; 6,0 - 9,0) jeweils 10 Gele mit frisch präpa-  
rierten BMECs und 10 Gele aus AOECs (Aorta Endothelial Cells)  
erstellt und gescannt. Die Gele wurden dann mit Z3-Auswerte-  
software (Compugen) verglichen und differentielle Spots anno-  
tiert. Als Filter wurden dabei eine minimale Spotgröße von 100  
25 Pixel angenommen. Die Proteinspots, die in BMECs höher (dreifache  
Menge oder mehr) oder einzigartig detektiert werden  
konnten, wurden mit einer 1000 µl-Spitze auf einem Blaulicht-  
tisch (MoBiTec) ausgestochen und in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß  
überführt. Die ausgestochenen Spots wurden beschriftet und bis  
30 zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### Hydrolyse und massenspektrometrische Analyse der Proteinproben

Das in der Gelmatrix fixierte, ausgestochene Protein wurde aus dem -80°C Kühlschrank entnommen und durch Zugabe von 100 µl bidestilliertem Wasser gewaschen. Dazu wurde der jeweilige  
5 Ansatz 20 min bei 25°C unter Schütteln inkubiert und dann der Überstand abpipettiert und verworfen. Der Vorgang wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Daran wurde zweimal mit 100 µl 50% (v/v) Acetonitril überschichtet und jeweils 15 min bei 25°C unter Schütteln inkubiert. Erneut wurden die Überstände  
10 verworfen. Durch die Zugabe von 100 µl 100% Acetonitril und 15 minütiger Inkubation bei 25°C unter Schütteln erfolgte eine vollständige Dehydratisierung des Gelstückes. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Gelstück 5 min an der Luft getrocknet. Danach wurde das Gelstück in 15 µl Hydrolysepuffer (50 mM  
15 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 25 ng - 50 ng/15 µl Trypsin V) wieder rehydratisiert und gequollen. Die Hydrolyse der Proteine erfolgte durch Inkubation bei 37°C für 18 h. Für die Erstellung eines Peptid- „Fingerprints“ mittels Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) werden die Hydrolysen mit 15 µl 0,1% (v/v)  
20 Trifluoressigsäure angesäuert. Die verwendeten ZipTip-C18- Pipettenspitzen werden durch dreimaliges Rehydratisieren mit je 10 µl 50% (v/v) Acetonitril und anschließendes dreimaliges Equilibrieren mit je 10 µl 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure vorbereitet. Das Auftragen der Probe erfolgt durch sieben- bis  
25 zehnmaliges Aufziehen des Überstandes des Hydrolyseansatzes. Gewaschen werden die ZipTips dann mit 10 µl 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure. Die Peptide werden direkt mit der Matrix ( $\alpha$ -Cyanozimtsäure, 50% (v/v) Acetonitril, 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure) durch drei- bis viermaliges Auf- und Abpipettieren  
30 auf den MALDI-Messträger eluiert. Nach Trocknen der Proben auf dem Träger werden die Proben zunächst massenspektrometrisch mittels MALDI-Fingerprint gemessen und analysiert. Dazu werden

am Voyager DE PRO (PerSeptive Biosystems) MALDI-Massenspektrometer die Proben im „Positive Reflector Mode“ mit einer Beschleunigungsspannung von 20000 V, einer Gitterspannung von 75%, einem Weichendraht von 0,02% und einer Verzöge-  
5 rungszeit von 220 ns gemessen. Dabei wird ein Massenfenster verwendet, das Massen zwischen 700 - 3500 Da berücksichtigt.

Die erhaltenen Massenlisten für jeden Proteinspot werden in eine Datenabfrage eingesetzt. Verwendet werden dabei drei verschiedene Programme: Mascot, MSFit und Profound.

Proteinspots, bei denen trotz eines guten Massen-Fingerprints keine Datenbank-Identifizierung möglich ist, werden mit ESI-Massenspektrometrie zur Generierung von Aminosäuresequenzinformation eingesetzt.

Nach der Hydrolyse wird der Hydrolyseansatz dafür mit 15 µl 15 0,2% (v/v) Ameisensäure angesäuert und 30 min unter Schütteln inkubiert. ZipTip-C18-Pipettenspitzen (MilliPore) werden währenddessen dreimal mit je 10 µl 50% (v/v) Acetonitril rehydratisiert und anschließend durch dreimal Waschen mit je 10 µl 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure equilibriert. Das Auftragen der Probe erfolgt durch sieben- bis zehnmaliges Aufziehen des Überstandes des Hydrolyseansatzes. Gewaschen werden die ZipTips dann mit 10 µl 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure, anschließend wird durch zweimaliges Waschen mit 0,1% (v/v) Ameisensäure umgepuffert und dann die Peptide durch fünf- bis 20 25 siebenmaliges Aufziehen von 2 µl 50% (v/v) Methanol eluiert.

Die erhaltenen Peptidgemische können entweder direkt oder mittels Liquid-Chromatographie (LC) gekoppelt mit ESI-Massenspektrometrie analysiert werden.

Für eine Direktmessung wird 1 µl der eluierten Probe in eine 30 Hohlnadel (Protana) gefüllt. Dabei wird zunächst ein Über-

sichtsspektrum mit einer Ionensprayspannung von 850 - 1000 V, einem Vorhanggasdruck von 20 psi, einem „Declustering“-Potential von 40 - 50 V, einem Fokussierungspotential von 245 V und der Spannung an der Mehrkanalplatte von 2000 - 2100 V im „Positive Mode“ gemessen. Der Scanbereich liegt dabei bei 100 - 1600 oder 410 - 1600 Th. Die im Spektrum detektierten Peptide werden einer stoßinduzierten Fragmentierung unterworfen. Dazu werden Produktionenspektren von jedem Peptid bei einer Ionensprayspannung von 850 - 1000 V, einem Vorhanggasdruck von 20 - 40 psi, einem „Declustering“-Potential von 40 - 50 V, einem Fokussierungspotential von 245 V, einer Quadrupolauflösung 0,7 - 1,0 amu, einer Kollisionenergie von 15 - 50 V und einer Spannung an der Mehrkanalplatte von 2100 - 2400 V aufgenommen. Der Scanbereich beträgt dabei 50 - 1600 Th.

Bei der Kopplung der nanoHPLC an das ESI-Massenspektrometer wird zunächst die Reversed phase(RP)-Vorsäule mit 2 µl Probe bei einem Fluss von 20 µl/min 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure beladen. Die chromatographische Trennung der Peptide erfolgt über eine RP-C18-Säule (LC Packings) mit einem Gradienten über 35 min von den Anfangsbedingungen (0,05 % (v/v) Ameisensäure, 10 % (v/v) Acetonitril) bis zu den Endbedingungen (0,05 % (v/v) Ameisensäure, 76 % (v/v) Acetonitril). Die Kopplung der HPLC mit dem Massenspektrometer erfolgt über eine Hohlnadel (New Objective). Die Einstellungen des Massenspektrometers werden so gewählt, dass während des LC-Laufes zwei Experimente durchgeführt werden können. Außer der Ionensprayspannung (1800 - 2200 V) entsprechen die dabei eingestellten Parameter den bereits oben aufgeführten. Es werden sowohl Übersichtsspektren als auch Produktionenspektren abwechselnd während des Laufes aufgenommen. Die Einstellungen sind bei den Produktionspektren so gewählt, dass die beiden intensivsten Signale des Übersichtsspektrums, die 2fach, 3fach oder 4fach geladen

und deren Intensität größer als 10 cps sind, anschließend über eine stoßinduzierte Fragmentierung analysiert werden. Der Scanbereich liegt dabei von 450 - 1600 Th. Die Auswertung der erhaltenen Spektren erfolgt in drei Stufen:

- 5    A)    Die Produktionenspektren, die Informationen über die Aminosäuresequenz des korrespondierenden Peptides enthalten, werden zunächst mit Hilfe des Softwareprogrammes MASCOT (Matrix Sciences) vollständig mit öffentlichen Datenbanken abgeglichen. Kann dabei keine Zuordnung des Peptides zu einem Protein erfolgen, werden
- 10    B)    die Produktionenspektren mit einem Softwaretool des Geräteherstellers zunächst automatisch sequenziert. Die so erhaltenen Aminosäuresequenzen wurden nach Shevchenko et al. über MSBlast mit den öffentlichen Datenbanken verglichen.
- 15    Konnte das Protein nicht identifiziert werden, wurden
- 20    C)    die Produktionenspektren manuell ausgewertet und die erhaltenen Aminosäuresequenzen mittels Blast oder FASTA mit den öffentlichen Datenbanken verglichen.

Nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren können gezielt BHS-spezifische Proteine oder auch Fragmente davon in Hirnkapillar-Endothelzellen identifiziert werden. Die vorstehende Beschreibung erlaubt natürlich Routinevariationen, die einem Fachmann offensichtlich sind. Beispielsweise können folgende Verfahrensschritte variiert werden:

- 25    -    Als Aufschlussverfahren können auch andere dem Fachmann bekannte Verfahren zur Gewinnung der Proteine verwendet werden, die in der Standardliteratur beschrieben sind (z.B. „2D-Proteome Analysis Protocols“)

- Für die isoelektrische Fokussierung können natürlich entsprechende Fokussierungsgel von anderen Herstellern eingesetzt werden. Auch verschiedene Längen und pH-Gradienten können eingesetzt werden.
- 5 - Für die Trennung in der zweiten Dimension können natürlich entsprechende Gelsysteme anderer Hersteller verwendet werden. Auch ist die Verwendung weiterer Gelgrößen möglich.
- Standardmäßig können auch andere dem Fachmann bekannte Proteasen zur Herstellung des Peptidmusters verwendet werden.
- Zur Bestimmung der Peptidmassen und de novo Aminosäuresequenzen können auch Massenspektrometer anderer Bauart und anderer Hersteller verwendet werden.
- 15 - Zur Bestimmung der Peptidmassen und der de novo Aminosäuresequenzierung können die massenspektrometrischen Bedingungen sowohl apparativ als auch funktionell entsprechend der Probe variiert werden.

Im Folgenden wird nun die Identifizierung BHS-spezifischer Proteine oder Fragmente davon in Hirnkapillar-Endothelzellen über den Genomics-Ansatz beschrieben.

#### **Identifizierung BHS-spezifischer Transkripte durch cDNA-Subtraktion**

Die gezielte Identifizierung zell- oder gewebespezifischer Proteine erfolgt durch differentielle Verfahren. Dies kann auf Proteinebene durch den Vergleich von 2D-Gelen von Aufschlüssen verschiedener Gewebe bzw. Zellen und durch anschließende Ermittlung der für ein Gewebe bzw. einen Zelltyp spezifischen Proteine erfolgen. Um von den physikalischen Eigenschaften von

Proteinen (Größe, Löslichkeit) unabhängig zu sein, können zur Identifizierung spezifischer Proteine auch differentielle Verfahren auf Transkriptebene durchgeführt werden. Solche subtraktiven RNA-Techniken haben zusätzlich den Vorteil, 5 weniger Gewebe bzw. Zellmaterial zu benötigen.

Zur Identifizierung BHS-spezifischer Proteine ist die Verwendung frisch isolierter BMEC als Ausgangsmaterial entscheidend. Bisher beschriebene Verfahren beruhten bestenfalls auf der Subtraktion von RNA aus Hirnkapillaren gegen RNA aus Niere (Li 10 et al., 2001). Problematisch hierbei ist, dass Hirnkapillaren 15 neben BMEC auch andere Zelltypen, wie Perizyten und Astrozyten, enthalten. Weiterhin ist das Subtraktionsgewebe Niere sehr heterogen, da es aus verschiedenen Zelltypen besteht, von denen Endothelzellen nur einen kleinen Teil ausmachen. Erfindungsgemäß ist ein Subtraktionsgewebe zu verwenden, das eine gezielte Identifikation von Transkripten bzw. Proteinen erlaubt, die spezifisch für die Blut-Hirn-Schranke sind. Grundsätzlich können beliebige Endothelzellen als Vergleichsgewebe verwendet werden, beispielsweise makro- und microvaskuläre 20 Endothelzellen des gleichen Gewebes oder auch Endothelzellen aus anderen Organen, z.B. Herz, Lunge, Niere, Leber, Aorta etc. Es können auch aus Kultur gewonnene dedifferenzierte BMEC verwendet werden. Es ist jedoch bevorzugt ein anderer Endothelltyp als Vergleichsgewebe gegen Hirnkapillar- 25 Endothelzellen zu verwenden. Bevorzugt werden Endothelzellen aus Aorta verwendet, die keine Barrierefunktion aufweisen. Dies hat zusätzlich den Vorteil, dass Mikrogefäße gegen Makrogefäß verglichen werden können. Es können ferner auch andere mikrovaskuläre Endothelzellen benutzt werden. Ebenfalls geeignet sind unter anderen Bedingungen kultivierte Hirnkapillar- 30 Endothelzellen als Vergleichsgewebe, z.B. unter anderen Bedingungen bzgl. pH-Wert, Wachstumsmatrix, Wachstumsfaktoren (z.B.

Zytokine etc.). Aus den bekannten Eigenschaften der Hirnkapillar-Endothelzellen gegenüber den jeweiligen Vergleichsgewebe ergibt sich die physiologische Bedeutung der identifizierten Targets. Erfindungsgemäß bevorzugt werden zwei definierte 5 Zelltypen verwendet: Frisch isolierte BMEC als der Zelltyp mit Schrankenfunktion und Endothelzellen aus Aorta, die also wie BMEC auch Endothelzellen sind, jedoch keine Schrankenfunktion aufweisen. Dieser Ansatz erlaubt viel gezielter Transkripte bzw. Proteine zu identifizieren, die zur Ausbildung der Blut- 10 Hirn-Schranke beitragen.

#### **Herstellung der subtraktiven cDNA-Bank**

Gesamt-RNA wird aus den Zellen mit Trizol (Invitrogen) nach den Herstellerangaben isoliert. Die Gesamt-RNA wird anschließend auf einem denaturierenden Agarosegel auf ihre Intaktheit 15 überprüft. Zur RNA-Isolierung werden 100 mg Gewebe bzw. 10 cm<sup>2</sup> konfluent gewachsene Zellen in je 1 ml Trizol mechanisch homogenisiert und das Homogenat anschließend 5 min bei RT inkubiert. Danach werden 0,2 ml Chloroform / 1 ml Trizol (Invitrogen) gegeben, 15 sec durch vortexen gemischt and 3 min 20 bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wird 15 min bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugiert und im Anschluss daran die obere, wässrige Phase in ein frisches Gefäß überführt. Hierzu wird 0,5 ml Isopropanol / 1 ml Trizol gegeben, gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die RNA wird durch 10 min Zentrifugation bei 25 4 °C und 12.000 x g sedimentiert, zweimal mit 75 % ETOH gewaschen, an der Luft getrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die Konzentration wird spektralphotometrisch bestimmt und die Qualität in einem denaturierenden Agarosegel überprüft.

30 Ausgehend von Gesamt-RNA wird die mRNA mit Hilfe von Dynabeads (Dynal) nach den Herstellerangaben angereichert.

mRNA-Anreicherung: 75 µg Gesamt-RNA wird 2 min bei 65 °C denaturiert, sofort zu 200 µl Dynabeads Oligo(dT)<sub>25</sub> (Dynal) in zweifach Bindepuffer gegeben und 5 min unter Mischen inkubiert. Der Überstand der magnetischen Separation wird verworfen und die Dynabeads zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Die polyA<sup>+</sup>-RNA wird schließlich mit 20 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5 für 2 min bei 85 °C eluiert.

Die Herstellung der subtraktiven cDNA-Bank kann mit handelsüblichen PCR Subtraktionskits durchgeführt werden. Beispielsweise kann der *PCR-Select cDNA Subtraction Kit* der Firma Clontech nach den Herstellerangaben verwendet werden.

Hierzu werden jeweils 2 µg mRNA aus BMEC (Tester) und AOEC (Driver) ausgehend von einem Oligo(dT)-Adapterprimer mit dem Enzym AMV Reverse Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Direkt im Anschluss daran wird die Zweitstrangsynthese mit einem Enzymgemisch (DNA Polymerase I, RNase H und DNA Ligase) für zwei Stunden bei 16 °C und mit anschließender Zugabe von T4 DNA Polymerase und weiterer Inkubation bei 16 °C für 30 Minuten durchgeführt. Die so hergestellte doppelsträngige cDNA wird durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung gereinigt.

Zur Einführung geeigneter Enden für die spätere Adapterligation sowie zur Erzeugung einer einheitlicheren Größenverteilung der cDNA-Fragmente erfolgt nun eine Restriktion mit *Rsa* I. Die so hergestellten doppelsträngigen cDNA-Fragmente werden durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung gereinigt. Die Produkte der cDNA-Synthesen sowie der Restriktionen werden gelelektrophoretisch auf Reinheit überprüft.

Für die spätere Amplifikation durch PCR werden nun die Adaptern 1 und 2R über die *Rsa* I-Enden an die Tester-cDNA mit dem

Enzym T4 DNA Ligase angehängt. Die Ligation wird mittels PCR überprüft.

Die eigentliche Subtraktion erfolgt durch zwei Hybridisierungen. Für die erste Hybridisierung wird in einem Ansatz cDNA aus BMEC-Adapter 1 mit AOEC cDNA hybridisiert, in einem anderen Ansatz cDNA aus BMEC-Adapter 2R mit AOEC cDNA. In der zweiten Hybridisierung werden die beiden Ansätze aus der ersten Hybridisierung vereinigt und mit frisch denaturierter cDNA aus AOEC hybridisiert.

Die Produkte aus der Hybridisierung werden schließlich als Matrize (Template) in eine erste PCR-Reaktion eingesetzt; als Primer dient hier ein Oligonukleotid aus dem gemeinsamen Bereich der beiden Adaptoren 1 und 2R.

Das Produktgemisch dieser ersten PCR wurde nun als Matrize in eine verschachtelte PCR (nested PCR) eingesetzt, wobei die beiden ineinander angeordneten Primer jeweils aus dem einzigartigen Bereich der beiden Adaptoren 1 und 2R stammen. Diese zweite PCR erhöht die Spezifität.

Die Effizienz der Subtraktion wurde durch vergleichende PCR an einem Haushalts-Gen (GAPDH) überprüft: Mit der cDNA aus der Subtraktion kann im Vergleich zu den beiden nicht subtrahierten cDNAs aus BMEC und AOEC erst nach signifikant mehr PCR-Zyklen eine Produktbildung erfolgen. GAPDH wird als typisches Haushaltsgen in allen Geweben und Zelltypen in vergleichbarer Stärke exprimiert. Es sollte deshalb bei einer subtraktiven Hybridisierung nicht wie differentiell exprimierte Gene angereichert werden, sondern die Transkriptmenge sollte in den subtrahierten cDNAs (sowohl forward als auch reverse subtraction) im Vergleich zu den cDNAs aus BMEC bzw. AOEC vor der Subtraktion stark abnehmen. Experimentell wird dies bestätigt, indem die beiden cDNAs vor der Subtraktion bzw. die jeweils

subtrahierten cDNAs in eine PCR mit GAPDH-spezifischen Primern eingesetzt werden. Da mit den subtrahierten cDNAs eine erste Produktbildung erst nach zusätzlichen 16 Zyklen im Vergleich zu den beiden nicht subtrahierten cDNAs erzielt wird, findet 5 folglich durch die Hybridisierung eine Anreicherung um mindestens den Faktor 50.000 statt. Diese Anreicherung ermöglicht die gezielte Identifizierung BHS-spezifischer Transkripte und stellt auch bereits eine erste Validierung der isolierten Sequenzen dar.

10 Die Produkte der zweiten PCR werden in den Vektor pT-Adv (Clontech) kloniert und in TOP10F' (Clontech) chemokompetente *E.coli* transformiert. Die Produkte der zweiten PCR werden in den Plasmid-Vektor pT-Adv (Clontech) kloniert. Dieser Vektor besitzt an den 5' Enden überstehende dT-Reste, die zu den 3' 15 dA-Resten kompatibel sind, die z.B. durch Taq DNA-Polymerase an PCR-Produkte angehängt werden. Dieses bzw. vergleichbare Systeme erlauben die direkte Klonierung von PCR-Produkten mit hoher Effizienz. Die Transformation erfolgt in chemokompetente *E. coli* TOP10F' (Clontech) wie in der Literatur beschrieben 20 (Sambrook et al., 1989).

#### Differentielle Hybridisierung

Klone aus der subtraktiven cDNA-Bank werden durch differenzielle Hybridisierung bezüglich ihrer Expression BMEC vs. AOEC verifiziert. Hierzu wird das *PCR-Select Differential Screening Kit* (Clontech) benutzt. Die *reverse subtracted probe* wurde mit dem *PCR-Select cDNA Subtraction Kit* der Firma Clontech nach Herstellerangaben wie oben beschrieben hergestellt, wobei BMEC 25 als *Driver* und AOEC als *Tester* dient.

Entsprechend den Herstellerangaben werden in Mikrotiterplatten 30 mit 96 Kavitäten Flüssigkulturen der Klone angeimpft. Diese werden als Template zur Amplifizierung der Insertionen mit den

Primern Adaptor 1 und 2R eingesetzt. Der Rest der Flüssigkulturen wird mit Glycerin versetzt und als Dauerkultur eingefroren. Die PCR-Produkte werden gelelektrophoretisch überprüft. Von Produkten, die größer als 200 bp waren, wird jeweils 1  $\mu$ l 5 auf zwei identische HybondN-Membranen gespottet und auf diesen mit UV-Licht fixiert. Abweichend von den Herstellerangaben werden jeweils nur zwei Filter à 92 Klone hybridisiert: ein Filter mit der *forward subtracted probe*, in der BMEC- spezifische Transkripte angereichert sind, und der andere 10 Filter mit der *reverse subtracted probe*, in der AOEC- spezifische Transkripte angereichert sind. Auf die Hybridisierung zweier weiterer Filter mit cDNA aus BMEC bzw. AOEC wurde verzichtet, da hieraus keine relevante Zusatzinformation zu 15 entnehmen ist. Statt dessen wird RNA aus BMEC und AOEC bei der späteren Verifizierung in Northern-Blot-Analysen bzw. RT-PCR- Experimenten zur Erstellung von Expressionsmustern eingesetzt. Pro Filter werden PCR-Produkte von 92 Klonen aus der subtraktiven cDNA-Bank sowie zwei Negativkontrollen des Herstellers aufgetragen. Zusätzlich zu den Herstellerangaben wird je ein 20 PCR-Produkt eines Haushaltsgens gespottet, das in BMEC und AOEC gleich stark exprimiert wird, sowie als Positivkontrolle ein PCR-Produkt zu einem BHS-Marker (Apolipoprotein A1), der in BMEC stärker exprimiert ist als in AOEC.

Die Hybridisierungen werden wie vom Hersteller beschrieben mit 25 Sonden gleicher Aktivität bei 72°C mit „ExpressHyb“-Lösung (Clontech) durchgeführt und die Filter anschließend stringent gewaschen. Es können übliche Bedingungen der Stringenz verwendet werden. Günstigerweise werden die Filter 2 x 20 min bei 68°C bis zu einer Stringenz von 0,2 x SSC/0,5% SDS gewaschen. 30 Die Signalintensitäten werden durch Expositionen verschiedener Zeitdauer auf einem Film mit Hilfe eines Phosphoimagers (FLA- 5000, Fuji) ermittelt. Klone, die ein ca. fünfmal stärkeres

Signal in BMEC als in AOEC zeigten, werden als differentiell exprimiert eingestuft und weiterverarbeitet.

Von positiven Klonen werden aus der Dauerkultur Flüssigkulturen angeimpft und die Plasmid-DNA nach Standardmethoden (Birnboim and Doly, 1979) mit Hilfe von Qiagen-Säulen isoliert. Die Insertionen der Plasmide werden mit Universalprimern und gegebenenfalls zusätzlichen genspezifischen Primern sequenziert. Datenbanken werden mit den erhaltenen DNA-Sequenzen mit Hilfe der Algorithmen BLAST

10 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) und FASTA  
(http://www.ebi.ac.uk/fasta33) auf Homologien durchsucht.

#### Weitere Verifizierung BHS-spezifischer Transkripte: Expressionsmuster

Von den interessierenden positiven Klonen werden Expressionsmuster in BMEC, AOEC und neun weiteren Geweben erstellt. Dies erfolgt durch RT-PCR und/oder Northern-Blot-Analysen.

Für RT-PCR Experimente werden cDNAs ausgehend von Gesamt-RNA durch *random priming* hergestellt. Alle benutzten Enzyme sowie die *random* Hexamere stammen von Invitrogen. Hierzu werden jeweils 10 µg Gesamt-RNA in 40 µl Nuklease-freiem Wasser mit 5 µl DNase I 10x Puffer sowie 5 µl DNase I versetzt und 15 Minuten bei 25 °C inkubiert. Anschließend werden 5 µl 25 mM EDTA zugegeben und das Enzym für 15 Minuten bei 65 °C hitzedeaktiviert. Von dem Ansatz werden 25 µl entnommen, mit Nuklease-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt und als -RT Kontrolle bei -80 °C gelagert. Zu den restlichen 25 µl Gesamt-RNA aus dem DNase I-Verdau werden 8 µl *random primer* (100 ng/µl), 3 µl dNTP-Mix (je 10 mM) und 2 µl Nuklease-freies Wasser gegeben. Nun werden für 5 Minuten bei 65 °C die RNA Sekundärstrukturen aufgelöst und die Probe anschließend sofort auf Eis gestellt. Es werden 10 µl 5x 1st strand buffer, 6 µl DTT (100 mM) und

3 µl RNaseOUT zugegeben, 10 Minuten bei 25°C zur Primeranlagerung inkubiert und anschließend 2 Minuten auf 42°C temperiert. Nun werden 3 µl SuperScript II Reverse Transcriptase zugegeben und 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Danach wird das Enzym 15 5 Minuten bei 70°C hitzedeaktiviert. Um die Gesamt-RNA von der cDNA abzubauen, werden 3 µl RNase H zugegeben und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Abschließend wird mit Nuklease-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt und die cDNA bei -80°C gelagert. Die Qualität der cDNAs wird durch PCR mit Primern für ein 10 Haushaltsgen (GAPDH) bzw. für die 18S rRNA überprüft. Hierbei ist zu erwarten, dass jeweils vergleichbare Produktmengen mit den cDNAs aus den verschiedenen Geweben bzw. Zellen entstehen. Die so hergestellten cDNAs werden jeweils zur Erstellung von Expressionsmustern für die zu untersuchenden Transkripte 15 eingesetzt.

Für Northern-Blot-Analysen zur Erstellung von Expressionsmustern wird Gesamt-RNA aus den Zellen bzw. Geweben in denaturierenden Gelen nach Größe getrennt, auf eine Nylon-Membran übertragen und dort mit radioaktiv markierten, genspezifischen 20 Sonden hybridisiert. 6,0 g Agarose wird unter Erhitzen in 290 ml DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Danach wird im Wasserbad auf 60°C abgekühlt und 40 ml 10x MOPS-Puffer (200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA) sowie 70 ml Formaldehyd zugegeben. Schließlich wird ein Maxigel mit einem großen 25 Taschenformer (12 Spuren) im Abzug gegossen und dort erstarren lassen. Jeweils 15 µg Gesamt-RNA in 10 µl werden mit 40 µl Probenpuffer (500 µl deionisiertes Formamid, 160 µl Formaldehyd, 100 µl 10x MOPS, 240 µl DEPC-behandeltes Wasser) für 15 Minuten bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis überführt. Nun werden 10 µl Beladungspuffer (500 µl Glycerin, 2 µl 30 500 mM EDTA, 25 µl 10% Bromphenolblau, 473 µl DEPC-behandeltes Wasser) zugegeben und die Probe auf das mit 1x MOPS-Puffer

überschichtete Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird für 3-4 h bei 250 V durchgeführt. Danach wird das Gel erst 10 Minuten in Wasser geschwenkt, anschließend 30 Minuten in 10x SSC. Ein auf Gelgröße zugeschnittener Hybond XL-Filter wird 15 Minuten in 10x SSC geschwenkt.

Aufbau des Blots (von unten nach oben): Salzbrücke (taucht in Pufferreservoir mit 10x SSC ein), Gel, Filter, 5 3MM (vorher in 10x SSC eingelegt), ca. 7 cm grüne Tücher (Zellstofftücher), Glasplatte, Gewicht von ca. 0,5 kg. Das Blotting erfolgt für 16-20 h. Danach wird der Blot abgebaut und der Hybond XL-Filter für 10 Minuten in 2x SSC gewaschen. Die RNA wird nun in einem UV-Crosslinker mit 70.000  $\mu$ J/cm<sup>2</sup> auf dem Hybond Filter fixiert. Danach wird der Filter 1 Minute in Färbelösung (300 mg Methylenblau in 1 L 0,3 M Na-Aacetat) gefärbt, um die RNA sichtbar zu machen und danach zum Entfärben des Hintergrunds 2 Minuten mit Wasser gewaschen. Die gefärbten Filter werden photographisch dokumentiert. Anschließend wird der Filter zwischen 3MM-Papier getrocknet, in Saran Wrap eingepackt und bei -20°C gelagert.

Die Hybridisierungen erfolgen mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden (*Rediprime II*, Amersham), die über ProbeQuant G-50 Säulen (Amersham) gereinigt wurden, unter Benutzung von *ExpressHyb* Lösung (Clontech) nach den Herstellerangaben. Nach einer ersten Überprüfung der Hybridisierung mit Hilfe des Phosphoimagers FLA-5000 (Fuji) werden Autoradiogramme auf Biomax MS-Filmen (Kodak) angefertigt.

#### Vervollständigung von cDNA-Sequenzen

Zu interessierenden BHS-spezifischen Klonen aus der subtraktiven cDNA-Bank werden die vollständigen cDNA-Sequenzen durch Durchmusterung von verschiedenen cDNA-Banken und RACE-PCR Experimente ermittelt.

Eine cDNA-Bank wird aus BMEC von Schwein mit dem *SMART cDNA Library Construction Kit* (Clontech) im Vektor  $\lambda$ TriplEx2 nach den Herstellerangaben angelegt. Hierzu wird zuerst wie oben beschrieben Gesamt-RNA mit *Trizol* (Invitrogen) isoliert und daraus polyA<sup>+</sup>-RNA mit Hilfe von *Dynabeads* (Dynal) angereichert. Zur Herstellung der Bank werden 2  $\mu$ g polyA<sup>+</sup>-RNA aus BMEC eingesetzt. Abschließend werden die Ligationen *in vitro* mit dem Phagenextrakt *Gigapack III Gold* (Stratagene) nach den Herstellerangaben verpackt. Die Anzahl unabhängiger Phagen der cDNA-Bank aus BMEC beträgt 1,3 Millionen pfu, von denen mehr als 99% bei Durchführung eines Blau/Weiß-Tests (vgl. Sambrook et al., 1989) rekombinant waren. Mindestens die Hälfte der Insets hat eine Größe von mehr als 1 kb. Nach Amplifikation der kompletten Bank beträgt der Titer ca.  $2 \times 10^{10}$  pfu/ml bei einem Gesamtvolumen von ca. 150 ml. Dieses Phagenlysat wird auf 7 (v/v) % DMSO eingestellt und bei -80°C gelagert. Die beschriebene Phagenbank wird in eine Plasmidbank nach Herstellerangaben (Clontech *ClonCapture cDNA Selection Kit*) konvertiert, indem *E.coli* BM25.8 mit 2 Millionen pfu der Phagenbank infiziert wurden. Dieser Bakterienstamm exprimiert Cre-Rekombinase, welche die loxP-Stellen in dem Vektor  $\lambda$ TriplEx2 erkennt und so die Konvertierung ermöglicht. Die Umwandlung der lamda-Phagen in Plasmide erfolgt hierbei durch *in vivo*-Exzision und anschließende Zirkularisierung des vollständigen Plasmids. Die erhaltenen Plasmide werden dann stabil in *E. coli* weitergegeben. Die Plasmidpräparation erfolgt von Plattenkulturen infizierter BM25.8 mit dem *NucleoBond Plasmid Kit* (Clontech).

Zur Durchmusterung von cDNA-Plasmidbanken mit *ClonCapture* werden biotinylierte cDNA-Sonden eingesetzt. Diese bilden in einer RecA-vermittelten Reaktion DNA-Triplexstrukturen mit homologen Sequenzen der Plasmidinsertionen. Die so selektier-

ten Plasmide können über an magnetische Kugelchen gekoppeltes Streptavidin isoliert und in eine Transformation eingesetzt werden. Klone aus einer solchen Anreicherung werden dann durch Koloniehybridisierung durchmustert, von daraus resultierenden 5 positiven Klonen wird die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert.

Die Isolierung positiver Klone durch *ClonCapture* wird genau nach Herstellerangaben (Clontech) durchgeführt. Zur Sondenherstellung wurde zuerst eine PCR mit genspezifischen Primern an 10 einem geeigneten Plasmid optimiert, so dass nur ein Produkt entstand. Hierzu werden die Primer so gestaltet, dass sie maximal um 1°C voneinander abweichende Schmelztemperaturen haben sowie keine Primerdimere und keine stabilen Loops ausbilden. Die Annealing-Temperatur wird mit 2-5°C unter der nach 15 der Formel  $T_m = [(G+C) \times 4] + [(A + T) \times 2]$  berechneten Schmelztemperatur relativ hoch gewählt. Dies führt zu spezifischer Produktbildung, was sich bei der Kontrolle durch Gelektrophorese in nur einer Bande äußert. Von diesem Produkt wird mit einer sterilen Pasteur-Pipette ein Stück aus einem 20 Agarosegel entnommen und in 200 µl steriles Wasser überführt. Durch Verwirbeln und 30-minütige Inkubation bei 70°C wird die DNA aus dem Gelstück eluiert und dient als Matrize zur Sondenherstellung. Mit dieser Matrize werden Kontrollreaktionen mit 25 und ohne Biotin-21-dUTP durchgeführt und in einem Agarosegel analysiert, da Biotin die PCR inhibieren kann. Bei erfolgreicher Kontrollreaktion wird nun in einer präparativen PCR die biotinylierte Sonde unter gleichzeitiger Zugabe von 10 µCi  $[\alpha^{32}P]dCTP$  hergestellt. Nach 20 Zyklen werden 5 µl aus dem Ansatz auf einem Agarosegel überprüft und eventuell noch 5 weitere Zyklen angeschlossen. Anschließend wird das PCR- 30 Produkt mit dem *NucleoSpin Extraction Kit* (Clontech) nach Herstellerangaben gereinigt und mit 35 µl Elutionspuffer

eluiert. Hiervon werden 2  $\mu$ l gelelektrophoretisch analysiert und das Produkt spektralphotometrisch quantifiziert. Zur Überprüfung der Biotinylierung werden 2  $\mu$ l des gereinigten PCR-Produktes zu 15  $\mu$ l Magnetkügelchen gegeben und das Präinkubationssignal mit einem Geigerzähler ermittelt. Nach 30 Minuten Inkubation unter leichtem Schütteln werden die Magnetkügelchen im Magneten abgetrennt und der Überstand erneut mit dem Geigerzähler quantifiziert (Postinkubationssignal). Bei erfolgreicher Biotinylierung ist das Präinkubationssignal 2-4 mal stärker als das Postinkubationssignal.

Für das Capturing werden 50 (200 bp) - 100 (600 bp) ng biotinyliertes PCR-Produkt in Wasser 5 Minuten bei 100°C denaturiert und danach sofort auf Eis überführt. Nun werden alle Komponenten außer der Plasmid-DNA zugegeben, wobei 2  $\mu$ g RecA-15 Protein pro 50 ng Sonde eingesetzt werden. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C wird 1  $\mu$ g der Plasmid-Bank zugegeben und weitere 20 Minuten bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit werden 15  $\mu$ l Magnetkügelchen mit Heringssperma-DNA unspezifisch abgesättigt und für die Reinigung des Capturings vorbereitet. Zum Capturing werden EcoR V geschnittene  $\lambda$ -DNA gegeben und nach Zugabe von SDS ein Proteinase K-Verdau für 10 Minuten 20 bei 37°C durchgeführt. Diese Reaktion wird schließlich durch Zugabe von PMSF abgestoppt und der Capturingansatz wird über die Magnetkügelchen aufgereinigt. Die isolierten Plasmide 25 werden mit 100  $\mu$ l Elutionspuffer eluiert, gefällt und anschließend in 10  $\mu$ l Wasser gelöst.

2  $\mu$ l der über ClonCapture angereicherten Plasmidbank werden in elektrokompetente *E.coli* DH5 $\alpha$  transformiert und auf LB-Amp Platten ausplattiert. Positive Klone werden durch Koloniehybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden (gleiches 30 Amplikon wie bei Biotinylierung) nach Standardverfahren identifiziert. Die so erhaltenen Klone werden durch Kolonie-PCR

weiter verifiziert, wozu ein Primer aus dem erwähnten Amplikon und ein weiterer, stromabwärts gelegener Primer benutzt wird. Es ist zu vermeiden beide Primer aus dem Amplikon zu wählen, das als Sonde für *ClonCapture* benutzt wurde, um bei der Kolonie-PCR [es wird ein PCR-Ansatz durchgeführt, in den anstelle von DNA Bakterien aus einer einzelnen Kolonie gegeben werden] zu vermeiden, dass die Produktbildung nicht an den in den Bakterien enthaltenen Plasmiden, sondern durch kontaminierende Sonde erfolgt. Deshalb sollte mindestens 1 Primer außerhalb des Amplikons liegen, am besten 3' dazu gelegen sein, da diese Sequenz sowohl bekannt ist als auch in allen positiven Klonen der cDNA-Bank enthalten ist. Von positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA nach Standardverfahren (Birnboim and Doly, 1979) mit Hilfe von Qiagen-Säulen isoliert und nach dem Kettenabbruchverfahren sequenziert (Sanger et al., 1977). Zur Sequenzierung kann der „ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Version 2.0“ (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben benutzt werden. Die Produkte der Sequenzierreaktionen werden auf dem „ABI Prism 310 Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems) analysiert.

Die RACE-PCR (Frohman et al., 1988) dient zur Ermittlung unbekannter cDNA-Sequenzen ausgehend von einem bekannten Sequenzabschnitt durch cDNA-Synthese gefolgt von der Einführung bekannter, synthetischer Enden zur Anlagerung des zweiten PCR-Primers.

Die 5'RACE-PCR wird mit dem *5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0* (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei erfolgt zuerst eine cDNA-Erststrangsynthese mit einem genspezifischen Primer (GSP1) und 1 µg Gesamt-RNA aus BMEC. An das 3' Ende dieser cDNA wird nach Reinigung der cDNA über GlassMAX-Säulen in einem zweiten Schritt mit Hilfe des Enzyms Terminal Desoxynukleotidtransferase

rase ein Oligo-dC-Schwanz angehängt. Die erste PCR erfolgt an 5 µl getailter cDNA mit einem weiteren genspezifischen Primer (GSP2) und dem *abridged anchor primer*, der sich an den Oligo-dC-Schwanz anlagert. Die Spezifität der PCR wurde mit Hilfe 5 einer zweiten, verschachtelten PCR erhöht, die mit dem *abridged universal amplification primer* und einem dritten genspezifischen Primer (GSP3) an 5 µl 1:100-verdünntem PCR-Produkt aus der ersten PCR durchgeführt wird. Als Kontrolle dienen bei der zweiten PCR Ansätze mit jeweils nur einem 10 Primer sowie eine Wasserkontrolle. Nach gelelektrophoretischer Analyse wird eventuell das Produkt der zweiten PCR kloniert, wozu eine Ligation mit dem *pGEM-Teasy System II* (Promega) und Transformation in elektrokompetente DH5 $\alpha$  durchgeführt wird. Die erhaltenen Klone werden mit Hilfe von Kolonie-PCR 15 untersucht, die Plasmid-DNA wird präpariert und schließlich in an sich bekannter Weise sequenziert.

Die 3'RACE-PCR kann mit dem *3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt werden. Bei der 3'RACE-PCR erfolgt die cDNA-Erststrang- 20 synthese an 5 µg Gesamt-RNA aus BMEC mit dem Oligo-dT *adapter primer*. Für die erste PCR werden 2 µl cDNA mit einem genspezifischen Primer (GSP1) und dem *abridged universal amplification primer* eingesetzt. Eine semi-nested zweite PCR wird wie bei der 5'RACE beschrieben mit einem genspezifischen Primer 25 (GSP2) und dem *abridged universal amplification primer* inklusive der Kontrollen durchgeführt. Die Produkte werden wie beschrieben kloniert und sequenziert.

Nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren können gezielt BHS-spezifische Proteine oder auch Fragmente davon in Hirnkapillar-Endothelzellen identifiziert werden. Die vorstehende 30 Beschreibung erlaubt natürlich Routinevariationen, die einem

Fachmann offensichtlich sind. Beispielsweise können folgende Verfahrensschritte variiert werden:

- Es können isolierte BMEC ausgesät werden und eine Primärkultur anstelle der frischen BMECs als „Tester“ bei der Subtraktion verwendet werden.
- Es kann ein anderes Subtraktionsgewebe („Driver“), z.B. dedifferenzierte BMEC aus der Kultur (min. Passage 2) gewählt werden.
- RNA bzw. mRNA können nach jeder anderen einem Fachmann bekannten Methode präpariert werden, mit der Maßgabe, dass die RNA intakt ist bzw. die mRNA sich durch Reverse Transkription in cDNA umschreiben lässt.
- Die PCR-Produkte aus der Subtraktion können in jedes geeignete Vektorsystem kloniert werden, sowohl über Polymerase-bedingte 3' dA-Reste, als auch über glatte Enden oder nach Restriktion. Die Transformation kann in verschiedene *E. coli*-Stämme erfolgen, sowohl in chemisch- als auch in elektrokompetente Zellen, wie auf dem Fachgebiet gut bekannt ist.
- Der Schritt der differentiellen Hybridisierung ist optional, aber empfehlenswert. Hierbei können auch andere geeignete Membranen (z.B. positiv geladene oder ungeladene Nylon-Membranen) sowie andere Hybridisierlösungen benutzt werden. Stringentes Waschen der Membranen kann auch bei anderen Temperaturen bzw. mit anderen Lösungen erreicht werden (z.B. niedrige Temperaturen und niedriger Salzgehalt bzw. höhere Temperatur und höherer Salzgehalt, z.B. T=50-70°C, 0,5-0,05 x SSC/0,1% 5DS).

- Expressionsmuster können auch durch quantitative PCR (*real-time* PCR) mit den entsprechenden cDNAs ermittelt werden. Die cDNAs können auch mit Hilfe anderer Systeme hergestellt werden. Northern-Blot Analysen können auch mit anderen geeigneten Sonden und Hybridisier-/Waschlösungen durchgeführt werden.
- cDNAs können auch durch *database mining* mit Hilfe bekannter, überlappender Sequenzen erweitert werden. Experimentell können auch beliebige andere cDNA-Banken aus Zellen bzw. Geweben, in denen das gesuchte Transkript vorkommt, mit verschiedenen Systemen durchmustert werden bzw. RNA aus Zellen bzw. Geweben, in denen das gesuchte Transkript vorkommt, in die RACE-PCR eingesetzt werden (vgl. Sambrook, 1989). Für RACE-PCRs können beliebige andere, geeignete, einem Fachmann bekannte Systeme benutzt werden.

Die mit diesem Verfahren identifizierten Proteine oder Fragmente besitzen eine Spezifität für die Blut-Hirn-Schranke und sind auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Die Kenntnis der Spezifität eines Proteins oder Fragments davon für die Blut-Hirn-Schranke erlaubt nun die gezielte Auffindung der Funktion des Proteins. In der Regel erfolgt die Funktionsermittlung mittels Vergleich mit bekannten Sequenzdaten in verfügbaren Datenbanken, zum Beispiel unter Verwendung des BLAST-Algorithmus. Die Kenntnis der Spezifität der identifizierten Proteine erlaubt ferner eine gezielte Modulation ihrer Expression in der Blut-Hirn-Schranke, wodurch pathologische Zustände gezielt therapiert werden können.

So können Agonisten oder Antagonisten zu den jeweiligen BHS-spezifischen Proteinen entwickelt werden, die selektiv deren Aktivität modulieren. Die Expression solcher Proteine kann auch direkt moduliert werden, z.B. durch Gentransfer oder

anti-sense RNA. Für therapeutische Ansätze besonders attraktiv ist die Entwicklung „Trojanischer Pferde“ - Medikamente, die an Moleküle gekoppelt sind, welche aktiv von identifizierten Transportern über die BHS transportiert werden. Möglich sind 5 auch sogenannte *pro drugs*, Substanzen, die von BHS-spezifischen Enzymen in den Endothelzellen modifiziert werden und so ihre therapeutische Wirkung erlangen.

BHS-spezifische Proteine erfüllen vielfältige Funktionen. Zum Beispiel dienen sie der Nährstoffversorgung (Beispiel Glucose-10 transporter GLUT1) oder dienen als Kontaktproteine (z.B. ZO-1 als tight junction-Protein). Ferner besitzen sie enzymatische Aktivität (z.B. Glutamyltranspeptidase GGT) oder fungieren als Transportvehikel für Aminosäuren.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wurden nun die folgenden 15 Proteine an der Blut-Hirn-Schranke identifiziert.

**Beispiel 1: Identifizierung von S129 = ITM2A**

Frisch aus dem Gehirn von Schweinen wie vorstehend beschrieben isolierte und gereinigte BMEC wurden in M199-Medium (Sigma) mit 10 (v/v) % Ochsen-Serum (PAA) auf Kollagen G (Biochrom) kultiviert und durch Trypsinieren passagiert. Aus kultivierten BMEC wurden von der Primärkultur (P0) sowie von den Passagen 1-3 (P1-3) aus jeweils einer T75 Zellkulturflasche Gesamt-RNA wie oben beschrieben isoliert. Hieraus wurde wie bereits beschrieben cDNA hergestellt und auf ihre Qualität untersucht. 25 Expressionsmuster wurden mit den jeweiligen genspezifischen Primern vergleichend zwischen frischen BMEC und P0-3 erstellt, jeweils unter Bezug auf GAPDH bzw. 18S rRNA. Es wurden die in diesem und in den folgenden Beispielen beschriebenen Klone erhalten.

Der subtraktive Klon S129 zeigte im differentiellen Screen mit der *forward probe* im Vergleich zur *reverse probe* ein > 5mal stärkeres Signal und wurde somit zur Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenz des Klons S129 ist als SEQ ID NO:1 angegeben.

5 Anhand dieser Sequenz wurde S129 eindeutig als Itm2A identifiziert.

Zuerst wurde wie beschrieben ein Expressionsmuster für Itm2A mit den Primern Itm2a.s2 (5' ACC TCC ATT GTT ATG CCT CCT A 3' = SEQ ID NO 2) und Itm2a.as2 (5' GTT GCC TCT CAC TCT TGA CAG A 3' = SEQ ID NO 3) erstellt, als Kontrolle wurde GAPDH benutzt. 10 Das Expressionsmuster wurde mittels RT-PCR erhalten (nicht dargestellt).

Das semi-quantitative Expressionsmuster zeigt, dass Itm2A in BMEC stärker exprimiert ist als in AOEC und bestätigt somit 15 das Ergebnis der differentiellen Hybridisierung. Außerdem ist die Expression in BMEC auch deutlich stärker als in Cortex (Gehirn), was ein Hinweis auf die Spezifität für BMEC im Gehirn ist. Lediglich im Herzen ist eine starke Expression zu sehen, was eventuell mit der beschriebenen Expression in 20 Muskel korreliert werden kann. Das Expressionsmuster wurde durch Northern-Blot-Analyse verifiziert, als Sonde diente hierbei die kodierende Region von Itm2A aus Schwein (Figur 1).

Im Northern Blot wird die Spezifität für BMEC noch deutlicher. Diese Expression in BMEC und somit an der BHS ist bisher nicht 25 beschrieben.

Weiterhin kann man im Northern Blot ein zweites, kleineres Transkript in BMEC erkennen. Um dieses zu charakterisieren wurden die kodierende Region, sowie 5' und 3' nichtkodierende Region mit RT-PCR bzw. RACE-PCR in BMEC untersucht. Hierbei 30 ergab sich, dass für Itm2A zwei 3' nichtkodierende Regionen existieren, wovon die kürzere durch ein alternatives Polyade-

nylierungssignal entsteht, wie sich durch Sequenzierung zeigte. Auch dies war bisher für Itm2A nicht beschrieben. Wahrscheinlich wird durch zwei verschiedene 3' Regionen die Transkriphäufigkeit über verschiedene Stabilitäten reguliert 5 und somit auch die Proteinmenge. Die beschriebenen Experimente lieferten auch die vollständige cDNA-Sequenz (vollständige CDS 119-910) für Itm2A aus Schwein (SEQ ID NO 4 + SEQ ID NO 5).

Um Hinweise auf eine mögliche Rolle von Itm2A an der BHS zu erhalten, wurde das Expressionsmuster in kultivierten BMEC im 10 Vergleich zu bekannten BHS-Markern bzw. GAPDH untersucht. Das Resultat ist in Figur 2 dargestellt. Diese Daten zeigen eine schnelle Abnahme der Expression vor Itm2A, wie auch für bekannte BHS-Marker beschrieben ist. Ein Haushaltsgen wie GAPDH zeigt dagegen keine Regulation.

15 Die Daten weisen deutlich auf eine Funktion von Itm2A an der BHS hin. Berücksichtigt man die Rolle des Proteins bei der Differenzierung in Chondrozyten und T-Zellen, kann man folgern, dass Itm2A auch für den besonderen Differenzierungsstand von Endothelzellen an der BHS verantwortlich ist. Da 20 Itm2A nachweislich in bestimmten Zuständen von Zellen in der Plasmamembran lokalisiert ist, stellt es hier dem Anschein nach einen Rezeptor dar, indem es eventuell Homo- oder Hetero- multimere bildet. Der extrazelluläre Anteil eines solchen Rezeptors würde sekretierte Moleküle oder Oberflächenmoleküle 25 anderer Zellen binden, der intrazelluläre Anteil des Rezeptorkomplexes könnte in einem solchen Modell - z.B. durch Konformationsänderungen aufgrund der erfolgten Bindung - Signale weiterleiten, die innerhalb von Signalkaskaden eine Antwort der Zelle auslösen und so deren Eigenschaften verändern.

30 Itm2A wurde in einem differentiellen Screen einer cDNA-Bank aus Kondylen (Gelenkkopf) aus Maus zuerst durch Delersnijder

et al. (1996) gefunden. Das kodierte Protein besteht aus 263 Aminosäuren und stellt ein integrales Membranprotein vom Typ II dar. Es besitzt eine potentielle Glykosilierungsstelle sowie einen möglichen leucine zipper. Das Gen, das aus sechs 5 Exons besteht, ist am stärksten in knochenbildenden Geweben exprimiert und stellt einen Marker für die Differenzierung Knorpel/Knochen dar. Itm2A ist Mitglied einer neuen Genfamilie, die aus drei Mitgliedern besteht. Zwischen Mensch und Maus sind die einzelnen Mitglieder der Familie jeweils hoch 10 konserviert. Die Konservierung unter den einzelnen Mitgliedern beträgt nur ca. 40%, wobei vor allem der C-Terminus konser- tiert ist, jedoch nicht der N-Terminus. Das leucine zipper Motiv findet sich nur bei Itm2A, ansonsten enthalten die Proteine der Familie keinerlei bekannte Sequenzmotive.

15 **Beispiel 2: Identifizierung von S231**

Der subtraktive Klon S231 zeigte im differentiellen Screen mit der forward probe im Vergleich zur reverse probe ein > 5mal stärkeres Signal und wurde somit zur Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenz des Klons S231 ist als SEQ ID NO:6 angegeben. Bei 20 BLAST-Homologiesuchen zeigte die Sequenz S231 die höchste Homologie zu EMP1.

Zuerst wurde wie beschrieben ein Expressionsmuster für S231 mit den Primern S231.1 (5' CCA TAA CTC TTT CAC GCA ACT G 3' = SEQ ID NO 7) und S231.1R (5' ACA ACA GAG GAG TTG GCT GTT T 3' = SEQ ID NO 8) erstellt, als Kontrolle wurde GAPDH benutzt 25 (siehe Figur 3).

Dieses semi-quantitative Expressionsmuster zeigt, dass S231 in BMEC stärker exprimiert ist als in AOEC und bestätigt somit das Ergebnis der differentiellen Hybridisierung. Außerdem ist 30 die Expression in BMEC auch deutlich stärker als in Cortex (Gehirn), was ein Hinweis auf die Spezifität für BMEC im

Gehirn ist. Lediglich im Herzen ist eine starke Expression zu sehen, jedoch nur schwach in Lunge, Colon oder Gehirn, obwohl für diese Gewebe eine starke Expression in der Literatur (Gehirn-nur für Ratte) beschrieben ist. Dies legt die Frage 5 nahe, ob S231 wirklich EMP1 aus Schwein darstellt oder ein anderes Mitglied dieser Genfamilie ist.

Um dies zu klären wurde die cDNA-Bank ( $\lambda$ TriplEx2) aus BMEC mit S231 als Sonde (radioaktiv markiert, Standardverfahren) durchmustert. Es wurden mehrere Klone isoliert, von denen die 10 beiden größten Klone jeweils 5' ansequenziert wurden. Beide Sequenzen zeigten wieder die größten Homologien zu EMP1, wobei die Überlappungen jeweils im 3' nichtkodierenden Bereich lagen.

Zur Untersuchung, ob es sich bei S231 tatsächlich um EMP1 aus 15 Schwein handelt, wurde mit den Primern hsEMP1.s1 (5' GGT ATT ·GCT GGC TGG TAT CTT T 3' = SEQ ID NO 9) und hsEMP1.as1 (5' ATG TAG GAA TAG CCG TGG TGA T 3' = SEQ ID NO 10), die aus der kodierenden Region des humanen EMP1 abgeleitet wurden, eine RT-PCR mit BMEC durchgeführt. Das erhaltene Produkt (ssEMP1) 20 wurde kloniert und sequenziert. Aus dieser Sequenz wurde der Primer ssEMP1.1 (5' GGT CTT TGT GTT CCA GCT CTT C 3' = SEQ ID NO 11) abgeleitet. Ein zweiter Primer ssEMP1.1R (5' TTC TCA GGA CCA GAT AGA GAA CG 3' = SEQ ID NO 12) wurde aus einem Abschnitt absoluter Übereinstimmung zwischen der kodierenden 25 Sequenz des humanen EMP1 und dem EST F23116 aus Schwein abgeleitet. Mit diesen beiden Primern ssEMP1.1/ssEMP1.1R wurde ein Expressionsmuster wie oben beschrieben erstellt (vgl. Figur 4).

Die Expressionsmuster mit den Primern aus Klon S231 und aus 30 ssEMP1 sind zwar ähnlich, jedoch keineswegs identisch. Deshalb

ist zu postulieren, dass S231 ein anderes Mitglied aus der pmp-22/emp/mp20-Genfamilie darstellt.

Beide Expressionsmuster wurden nun durch Northern-Blot-Analysen verifiziert, wobei als Sonde der Klon S231 (Fig. 5A) bzw. das PCR-Produkt hsEMP1.s1/hsEMP1.as1 (EMP1) (Fig. 5B) benutzt wurde (vgl. Figur 5).

Im Northern Blot wird die Spezifität für BMEC noch deutlicher. Diese Expression in BMEC und somit an der BHS ist bisher nicht beschrieben.

uffällig ist die im Northern Blot stärkere Expression in Plexus (hier war allerdings auch ca. die 2-3fache RNA-Menge aufgetragen) und Colon, wohingegen die Expression durch RT-PCR stärker im Herzen war. Weiterhin ist das Verhältnis der beiden Transkripte in BMEC deutlich verschieden, abhängig von der 15 benutzten Sonde. Mit S231 ist das Verhältnis von größerem zu kleinerem Transkript annähernd gleich, wohingegen bei EMP1 als Sonde das kleinere Transkript bedeutend stärker erscheint.

Im Vergleich zu Expressionsdaten von EMP1 in der Literatur fällt auf, dass S231 aus Schwein andere Transkriptgrößen als EMP1 aus Mensch und Maus aufweist und dass weiterhin das Expressionsmuster z.T. stark von den Literaturdaten zu EMP1 aus verschiedenen Spezies abweicht. Diese Abweichungen auf Transkriptebene zeigen, dass der hier beschriebene Klon S231 nicht EMP1 darstellt, sondern als S231 ein anderes Mitglied 25 dieser Genfamilie ist. Möglicherweise gibt es beim Menschen nur ein Gen EMP1, das von zwei Promotoren reguliert wird, und beim Schwein wird diese Aufgabe jedoch von zwei getrennten Genen - EMP1 und S231 - wahrgenommen.

Um die vollständige kodierende Region von S231 aus Schwein zu 30 erhalten, wurde die cDNA-Bank aus BMEC in pTriplEx2 mit EMP1

als ClonCapture-Sonde durchmustert. Hierbei wurden mehrere positive Klone isoliert, welche die vollständige kodierende Region enthielten. Diese wurde nun sequenziert und daraus die Proteinsequenz abgeleitet (SEQ ID NO 13 und SEQ ID NO 14).

5 Die Identität von S231 aus Schwein zu humanem EMP1 beträgt auf Aminosäureebene nur 78%, zu Maus beträgt sie 76%. Dies stärkt weiterhin die These, dass S231 nicht EMP1 darstellt, da normalerweise Proteine zwischen Mensch und Schwein 85-95% identisch sind (vgl. Figur 6).

10 Um Hinweise auf eine mögliche Rolle von S231 an der BHS zu erhalten, wurde das Expressionsmuster in kultivierten BMEC im Vergleich zu bekannten BHS-Merkern bzw. GAPDH wie in Beispiel 1 beschrieben untersucht (vgl. Figur 7). Diese Daten zeigen eine schnelle Abnahme der Expression von S231, wie auch für 15 bekannte BHS-Marker beschrieben ist. Ein Haushaltsgen wie GAPDH zeigt dagegen keine Regulation.

20 Die Daten weisen deutlich auf eine Funktion von S231 an der BHS hin. Berücksichtigt man die beschriebene Rolle des Proteins bei der Differenzierung anderer Zelltypen, kann man folgern, dass S231 für den besonderen Differenzierungszustand von 25 Endothelzellen an der BHS verantwortlich ist und möglicherweise ein Zelladhäsionsmolekül oder einen Kanal (Membrandomänen am stärksten konserviert) darstellt.

#### Beispiel 3: Identifizierung von S012

25 Der subtraktive Klon S012 zeigte im differentiellen Screen mit der forward probe im Vergleich zur reverse probe ein >5mal stärkeres Signal und somit zur Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenz des Klons S012 ist in SEQ ID NO 15 aufgeführt. Anhand dieser Sequenz konnte S012 eindeutig dem humanen hypothetischen Protein FLJ13448 zugeordnet werden.

Zuerst wurde wie vorstehend beschrieben ein Expressionsmuster für S012 mit den Primern S012.s1 (5' GTA TCG GGA GTG GAG GAT TAC A 3' = SEQ ID NO 16) und S012.as1 (5' CCC GAG GTA TAT TTG TTT CTG G 3' = SEQ ID NO 17) erstellt, als Kontrolle wurde 5 GAPDH benutzt (Expressionsmuster nicht gezeigt).

Dieses semi-quantitative Expressionsmuster zeigt, dass S012 in BMEC stärker exprimiert ist als in AOEC und bestätigt somit das Ergebnis der differentiellen Hybridisierung. Außerdem ist die Expression in BMEC auch deutlich stärker als in Cortex 10 (Gehirn), was ein Hinweis auf die Spezifität für BMEC im Gehirn ist. Lediglich im Herzen ist eine starke Expression zu sehen. Die full-length cDNA von porcinem S012/FLJ13448 wurde durch überlappende 5' und 3' RACE-PCR erhalten und ist zusammen mit der Proteinsequenz in SEQ ID NO 18 und SEQ ID NO 19 15 gezeigt.

Das Expressionsmuster wurde durch Northern-Blot-Analyse verifiziert, als Sonde diente hierbei der full-length Klon FLJ13448/S012 (SEQ ID NO 18) (vgl. Fig. 8).

Im Northern-Blot wird die Spezifität für BMEC noch deutlicher. 20 Diese Expression in BMEC und somit an der BHS ist bisher nicht beschrieben.

S012 ist homolog zu dem humanen hypothetischen Protein FLJ13448 und dem entsprechenden Homologon aus Maus (XM\_129724). Ein Homologievergleich von humanem, murinem und 25 procinem FLJ13448/S012 ist in Fig. 9 dargestellt. Die Peptide, die als Signalpeptide dienen und abgespalten werden, sind jeweils kursiv gedruckt.

Auffällig ist die geringe Konservierung der N-terminalen 60 Aminosäuren bzw. die hohe Homologie des C-Terminus. Wahrscheinlich stellt der N-Terminus ein Signalpeptid dar, dass 30

für die korrekte Lokalisation des Proteins in der Zelle verantwortlich ist. Bioinformatische Untersuchungen zeigen eine mitochondriale Lokalisation des Proteins in der Zelle. Die Funktion des Proteins ist dem stark konservierten C-Terminus 5 zuzuordnen.

Um Hinweise auf eine mögliche Rolle von FLJ13448/S012 an der BHS zu erhalten, wurde das Expressionsmuster in kultivierten BMEC im Vergleich zu bekannten BHS-Markern bzw. GAPDH untersucht wie in Beispiel 1 beschrieben (vgl. Fig. 10).

10 Diese Daten weisen eindeutig auf eine Rolle von FLJ13448/S012 an der BHS hin. Die starke Expressionsabnahme in kultivierten BMEC spricht dafür, dass FLJ13448/S012 mit dem Differenzierungszustand der Zellen in Zusammenhang steht.

#### Beispiel 4: Identifizierung von NSE2

15 Das Probenmaterial wurde wie vorstehend unter dem Abschnitt „Identifizierung BHS-spezifischer Proteine durch differentielle 2D-Gelelektrophorese“ beschrieben aufbereitet.

Der differentielle Spot 1.1.0.1.10.37 ergab in der MALDI-TOF-Analyse folgende Peptidmassen: 861,499; 878,47; 975,50; 056,61; 1132,53; 1198,71; 1216,71; 1227,53; 1347,69; 1430,76; 1438,69; 1516,71; 1623,79; 1790,87; 1796,81; 1935,93; 1954,05; 2081,02; 2231,07; 2375,08; 2577,09; 2613,1.

20 Durch die Datenbankabfragen mit Profound in der NCBI-Datenbank wurde Spot 1.1.0.1.10.37 als NSE2 identifiziert. Das humane NSE2 hat ein berechnetes Molekulargewicht von 34,5 kDa und einen pI-Wert von 5,4, was beides sehr gut mit der beobachteten Lage des Spots 1.1.0.1.10.37 im 2D-Gel übereinstimmt. Die fettmarkierten, unterstrichenen Peptidmassen konnten als der humanen Sequenz identisch zugeordnet werden. In Fig. 11 ist

die Abdeckung der Peptidmassen auf der humanen Proteinsequenz gezeigt.

Zuerst wurde wie beschrieben ein Expressionsmuster für NSE2 mit den Primern ssNSE2.s1 (5' CGC GTG GTG AAT GAT CTG TA 3' = 5 SEQ ID NO 20) und ssNSE2.as1 (5' CTC CAT GAT CAG GTC CTC CAG 3' = SEQ ID NO 21) erstellt, als Kontrolle wurde GAPDH benutzt.

Dieses semi-quantitative Expressionsmuster zeigt, dass die Expression von NSE2 im Herzen am höchsten ist, gefolgt von BMEC und Cortex (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis wurde durch Northern-Blot-Analyse bestätigt (vgl. Figur 12). Zur Hybridisierung wurde die partielle cDNA-Sequenz von NSE2 aus Schwein verwendet (SEQ ID NO 22 und SEQ ID NO 23) (partielle CDS 1-192, codiert C-Terminus), die durch 3'RACE-PCR erhalten wurde.

15 Um Hinweise auf eine mögliche Rolle von NSE2 an der BHS zu erhalten, wurde das Expressionsmuster in kultivierten BMEC im Vergleich zu bekannten BHS-Markern bzw. GAPDH wie in Beispiel 1 beschrieben untersucht. Das Ergebnis ist in Figur 13 gezeigt. Diese Daten zeigen eine schnelle Abnahme der Expression 20 von NSE2 und weisen somit auf eine Funktion von NSE2 an der BHS hin.

Figur 14 zeigt einen Homologie-Vergleich von humanem NSE2 und NSE1.

Potentielle Phosphorylierungsstellen sind in hellem Font 25 dargestellt. Unterstrichen ist eine mögliche Tyrosin-Kinasedomäne (ProSite Pattern Match PS00109), wobei der aktive Rest fett dargestellt ist. Figur 15 zeigt die Verteilung von PEST-Domänen in NSE2. PEST-Sequenzen sind Pro-, Glu-, Ser- und Thr-reich Regionen in Proteinen, die für eine kurze Halbwertszeit 30 solcher Proteine in der Zelle verantwortlich sind, indem

sie die Ubiquitinierung dieser Proteine kontrollieren. Phosphorilierung bestimmter Ser- oder Thr-Reste in den PEST-Regionen (hellgrau) sind für die Erkennung von Prozessierung durch den Ubiquitinproteasomeweg wichtig.

5 Position 81-163 in humanem NSE2 zeigt Homologien zur NLP/P60-Familie (pfam-Domäne 00877.4), die in mehreren Lipoproteinen gefunden aber der keine Funktion zugeordnet wurde.

#### Beispiel 5: Identifizierung von DRG-1

Das Probenmaterial wurde wie vorstehend unter dem Abschnitt „Identifizierung BHS-spezifischer Proteine durch differentielle 2D-Gelelektrophorese beschrieben“ aufbereitet.

Der differentielle Spot 1.1.0.1.11.12 ergab in der MALDI-TOF-Analyse folgende Peptidmassen: 789,45; 880,47; 890,50; 948,49; 1204,68; 1217,64; 1289,58; 1428,70; 1517,79; 1573,73; 1753,91; 15 2017,08..

Durch die Datenbankabfragen mit Profound in der NCBI-Datenbank wurde Spot 1.1.0.1.11.12 als hypothetisches Protein mit der Accession Number CAB66619 identifiziert. Das identische Protein wird in anderen Eintragungen der Datenbank auch als *dopamine responsive protein* DRG-1, als *LYST-interacting protein* LIP5 und als HSPC228 bezeichnet. Das hypothetische Protein CAB66619/DRG-1 hat ein berechnetes Molekulargewicht von 33,8 kDa und einen pI-Wert von 6,1, was beides sehr gut mit der beobachteten Lage des Spots 1.1.0.1.11.12 im 2D-Gel übereinstimmt. Die fettmarkierten Peptidmassen konnten als der humanen Sequenz identisch zugeordnet werden. In Fig. 16 ist die Abdeckung der Peptidmassen auf der humanen Proteinsequenz gezeigt.

Ein Homologievergleich zwischen Mensch (CAB66619) und Maus (XP\_125508) zeigt sehr große Homologien, vor allem im Bereich der AS 1-180. Bioinformatische Ansätze zeigen eine Transmembrandomäne und sprechen dafür, dass der N-Terminus intrazellulär lokalisiert ist. Die intrazelluläre Domäne zeigt eine konservierte Phosphorylierungsstelle, extrazellulär wird in der humanen Sequenz eine Glykosylierungsstelle vorhergesagt (vgl. Fig. 17).

Zuerst wurde wie beschrieben ein Expressionsmuster für DRG-1 mit dem CAB66619.s1 (5' CGA GAC CCT GTG GTG GCT TAT TAC 3' = SEQ ID NO 24) und CAB66619.as1 (5' CTG GTG TAT TAG CTG GAG CGT GTG 3' = SEQ ID NO 25) erstellt, als Kontrolle wurde GAPDH benutzt.

Dieses semi-quantitative Expressionsmuster (Figur 18; das 15 durch Northern-Blot-Analyse bestätigt wurde) zeigt, dass DRG-1 aus Schwein in BMEC schwächer exprimiert ist als in AOEC und widerspricht somit dem Ergebnis des 2D-Gels. Allgemein ist DRG-1 zwar unterschiedlich stark aber recht ubiquitär exprimiert. Somit muss der im 2D-Gel gefundene Unterschied auf eine 20 spezifische posttranskriptionale Modifikation von DRG-1 in BMEC zurückzuführen sein. Ein solcher Unterschied kann z.B. aufgrund der vorhergesagten Phosphorylierungsstelle auftreten. Zellspezifische Phosphorylierungen können so die Aktivität des Proteins bestimmen.

Um Hinweise auf eine mögliche Rolle von DRG-1 an der BHS zu erhalten, wurde das Expressionsmuster in kultivierten BMEC im Vergleich zu bekannten BHS-Markern bzw. GAPDH wie in Beispiel 1 beschrieben untersucht (vgl. Figur 19). Diese Daten zeigen eine deutliche Abnahme der Expression von DRG-1 und weisen somit 30 auf eine Funktion von DRG-1 an der BHS hin.

SEQ ID NO 26 + 27 zeigen die partielle cDNA-Sequenz von DRG-1 aus Schwein (CDS1-585, interner Abschnitt).

**Beispiel 6: Identifizierung von TKA-1**

Das Probenmaterial wurde wie vorstehend unter dem Abschnitt

5 „Identifizierung BHS-spezifischer Proteine durch differentielle 2D-Gelelektrophorese beschrieben“ aufbereitet.

Der differentielle Spot 1.1.0.1.6.30 ergab in der MALDI-TOF-Analyse folgende Peptidmassen: **776,44; 847,47; 900,50; 916,46; 976,52; 1048,58; 1085,61; 1127,66; 1137,55; 1167,67; 1180,68; 1212,69; 1234,69; 1291,67; 1301,67; 1303,69; 1338,72; 1350,70; 1370,65; 1419,70; 1423,77; 1434,79; 1440,79; 1456,76; 1466,76; 1467,71; 1483,77; 1547,78; 1558,85; 1665,90; 1714,96; 1716,90; 1740,80; 1762,90; 1838,92; 1897,99; 2025,11; 2054,06; 2234,15; 2243,20; 2244,18.**

15 Durch die Datenbankabfragen mit MSFIT in der NCBI-Datenbank wurde Spot 1.1.0.1.6.30 als TKA-1 identifiziert. Die fettmarkierten, unterstrichenen Peptidmassen konnten als der humanen Sequenz identisch zugeordnet werden. In Fig. 20 ist die Abdeckung der Peptidmassen auf der humanen Proteinsequenz gezeigt.

20 In der Datenbank sind 3 Isoformen von TKA-1 zu finden, die folgende berechneten Massen und pI-Werte besitzen: CAA90511 mit 49,3 kDa / pI 6,7, BAA33216 mit 37,4 kDa / pI 7,9, AAB53042 mit 36,2 kDa / pI 8,2. Die Lage im 2D-Gel spricht eindeutig gegen die große Isoform. Somit wurde hier experimentell eindeutig die BAA33216-Isoform gefunden, da in dem Protein mit der Accession-Number AAB53042 das Peptid **DGS~~AW~~KODPFO** (kursiv in Figur 20) fehlt, das jedoch teilweise (fett) innerhalb eines Trypsin-Fragmentes bei der MALDI-Analyse nachgewiesen wurde.

Das Alignment von TKA-1 zwischen Mensch, Maus und Ratte zeigt eine sehr hohe Konservierung. TKA-1 besitzt zwei PDZ-Domänen, die Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln. In diesen PDZ-Domänen befinden sich mehrere potentielle Phosphorilierungsstellen, wodurch möglicherweise die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen reguliert werden. Konserviert ist auch eine potentielle N-Glykosilierungsstelle.

Zuerst wurde wie beschrieben ein Expressionsmuster für TKA-1 mit den Primern ssSLC9A3R2.s1 (5' AAA AGG CCC CCA GGG TTA CG 10 3' = SEQ ID NO 28) und ssSLC9A3R2.as1 (5' GGA GTG GGC AGC AGG TGA GC 3' = SEQ ID NO 29) erstellt, als Kontrolle wurde GAPDH benutzt.

Das Expressionsmuster wurde durch Northern-Blot-Analyse verifiziert, als Sonde diente hierbei das 550 bp große PCR-Produkt 15 ssTKA-1.ctg zwischen den beiden Primern ssTKA-1ctg.s1 (5' TTA ACC TGC ACA GCG ACA AGT 3' = SEQ ID NO 30) und ssTKA-1ctg.as1 (5' TTG CTG AAG ATC TCA CGC TTC 3' = SEQ ID NO 31).

Der Northern Blot (Figur 21) zeigt, dass TKA-1 in BMEC am stärksten exprimiert ist sowie dass in BMEC drei verschiedene 20 Transkripte vorkommen. Die Expression ist vergleichbar stark in Lunge, allerdings fehlt hier das kleine Transkript vollkommen. Bisher ist in der Literatur kein Zusammenhang von TKA-1 zur BHS und auch nicht zu Endothelzellen beschrieben.

Um Hinweise auf eine mögliche Rolle von TKA-1 an der BHS zu erhalten, wurde das Expressionsmuster in kultivierten BMEC im Vergleich zu bekannten BHS-Markern bzw. GAPDH wie in Beispiel 1 beschrieben untersucht (vgl. Figur 22). Diese Daten zeigen eine deutliche Abnahme der Expression von TKA-1 und weisen somit auf eine Funktion von TKA-1 an der BHS hin.

SEQ ID NO 32 und SEQ ID NO 33 zeigen die partielle cDNA-Sequenz von TKA-1 aus Schwein (partielle CDS 1-741, codiert den C-Terminus).

Literatur:

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990): "Basic local alignment search tool", *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

5 Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979): "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA", *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1522.

Deleersnijder, W., Hong, G., Cortvrindt, R., Poirier, C., Tylzanowski, P., Pittois, K., Van Marck, E., and Merregaert, J. (1996): "Isolation of markers for chondro-osteogenic differentiation using cDNA library subtraction. Molecular cloning and characterization of a gene belonging to a novel multigene family of integral membrane proteins", *J. Biol. Chem.* **271**, 19475-19482.

15 Li, J.Y., Boado, R.J., and Pardridge, W.M. (2001): "Blood-brain barrier genomics", *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* **21**, 61-68.

20 Marvin, K.W., Fujimoto, W., Jetten, A.M. (1995): "Identification and characterization of a novel squamous cell-associated gene related to PMP22", *J. Biol. Chem.* **270**, 28910-28916.

Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988): "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", *PNAS* **85**, 2444-2448.

25 Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989).

Shevchenko A., Sunyaev S., Loboda A., Shevchenko A., Bork P., Ens W. and Standing K.G. (2001); "Charting the Proteomes of Organisms with Unsequenced Genomes by MALDI-Quadrupole Time-

of-Flight Mass Spectrometry and BLAST Homology Searching";  
Anal. Chem. 73: 1917-1926.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Esplora GmbH

<120> Verfahren zur Identifizierung BHS-spezifischer Proteine  
und Fragmente davon

&lt;130&gt; 12186DE

<140>  
<141>

&lt;160&gt; 34

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 323

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Klon S129 aus  
BMEC aus Schweinehirn

&lt;400&gt; 1

```

ctgcagccga ggacaacact gattcgagcc gtgacctacc ggccgcggga attcgattta 60
tggtaaaaat cgccttcaat acacccgcag cggtgaaaaa agaggaggcg cagcaagacg 120
tggaggccct cgtaagccat acggtccgtg ctcagatcct gactggcaag gaactccaag 180
ttgcactaa ggaaaaagag ggcttctctg ggagatgcat gcttaactctc gttaggcctt 240
ccttcatctt ggcaggactt attgttggtg gagcctgcat ttacaagtac ttcatgcccc 300
agagtaccat actaccatgg aga

```

323

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

&lt;400&gt; 2

ctccatttg ttatgcctcc ta

22

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

&lt;400&gt; 3

gttgcctctc actcttgaca ga

22

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1598

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Schwein

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (119)..(910)

&lt;400&gt; 4

gcggccgcta gcataaagaa ggtgattcta agcctagcgc tatcttctcc tagtccagcc 60

tgcagccgag gacaacactg attcgagccg tgacctaccg gccgcggaa ttgcattt 118

atg gtg aaa atc gcc ttc aat aca ccc gca gcg gtg caa aaa gag gag 166  
 Met Val Lys Ile Ala Phe Asn Thr Pro Ala Ala Val Gln Lys Glu Glu  
 1 5 10 15gcg cag caa gac gtg gag gcc ctc gta agc cat acg gtc cgt gct cag 214  
 Ala Gln Gln Asp Val Glu Ala Leu Val Ser His Thr Val Arg Ala Gln  
 20 25 30atc ctg act ggc aag gaa ctc caa gtt gcc act aag gaa aaa gag ggc 262  
 Ile Leu Thr Gly Lys Glu Leu Gln Val Ala Thr Lys Glu Lys Glu Gly  
 35 40 45tc tct ggg aga tgc atg ctt act ctc gta ggc ctt tcc ttc atc ttg 310  
 Ser Gly Arg Cys Met Leu Thr Leu Val Gly Leu Ser Phe Ile Leu  
 50 55 60gca gga ctt att gtt ggt gga gcc tgc att tac aag tac ttc atg ccc 358  
 Ala Gly Leu Ile Val Gly Gly Ala Cys Ile Tyr Lys Tyr Phe Met Pro  
 65 70 75 80aag agt acc atc tac cat gga gag atg tgc ttc ttt gat tct gcg gac 406  
 Lys Ser Thr Ile Tyr His Gly Glu Met Cys Phe Phe Asp Ser Ala Asp  
 85 90 95cct gca aat ttc ctc caa gga gga gag ccc tac ttc ctg cct gtg atg 454  
 Pro Ala Asn Phe Leu Gln Gly Gly Glu Pro Tyr Phe Leu Pro Val Met  
 100 105 110gaa gag gct gat att cgt gaa gat gac aac att gca atc att gat gtg 502  
 Glu Glu Ala Asp Ile Arg Glu Asp Asp Asn Ile Ala Ile Ile Asp Val  
 115 120 125t gtc ccc agt ttc tct gat agt gac cct gca gca att att cat gac 550  
 Val Pro Ser Phe Ser Asp Ser Asp Pro Ala Ala Ile Ile His Asp  
 130 135 140ttt gaa aag ggc atg act gct tac ctg gac ttg ctg ctg ggg aac tgc 598  
 Phe Glu Lys Gly Met Thr Ala Tyr Leu Asp Leu Leu Leu Gly Asn Cys  
 145 150 155 160tat ctg atg ccc ctc aat acc tcc att gtt atg cct cct aag tat ctc 646  
 Tyr Leu Met Pro Leu Asn Thr Ser Ile Val Met Pro Pro Lys Tyr Leu  
 165 170 175gtg gag ctc ttt ggc aaa ctg gca cgt ggc aaa tac ctc cct cac gct 694  
 Val Glu Leu Phe Gly Lys Leu Ala Arg Gly Lys Tyr Leu Pro His Ala  
 180 185 190tat gtg gtt cat gaa gac ctg gtt gct gtg gaa gag att cat gat gtt 742  
 Tyr Val Val His Glu Asp Leu Val Ala Val Glu Glu Ile His Asp Val  
 195 200 205

agt aac ctt ggc atc ttt att tac caa ctt tgc aac aac cgc aag tct 790  
 Ser Asn Leu Gly Ile Phe Ile Tyr Gln Leu Cys Asn Asn Arg Lys Ser  
 210 215 220  
  
 ttc cgc ctt cgt aga aga gac ctc ttg ctg ggt ttc aac aaa cgt gcc 838  
 Phe Arg Leu Arg Arg Asp Leu Leu Leu Gly Phe Asn Lys Arg Ala  
 225 230 235 240  
  
 att gat aag tgc tgg aag att aga cac ttc ccc aat gaa ttt att gtt 886  
 Ile Asp Lys Cys Trp Lys Ile Arg His Phe Pro Asn Glu Phe Ile Val  
 245 250 255  
  
 gag acc aag atc tgt caa gag tga gaggcaacag aaaaagagtg tacttagtaa 940  
 Glu Thr Lys Ile Cys Gln Glu  
 260  
  
 taggaagtca aagatttaca atatgacttc aatattaaag ttgttaggac attcaagata 1000  
 tttactcatg catttcctct attgcttata cttaaaaaaaaa agaaaagaaaaa taaaaaactac 1060  
 taaccattgc aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ctagtcgacg cgtggccaga aactgaaatg 1120  
 tatgatttt tatgttttgc cttttgaatt tatagggttt atgttttntt gaatgcaatg 1180  
 tgaagggtttt ggctaacatc ctgacaatga attccatccc ttgtgtatat gtgtgtcttt 1240  
 aaaaagtaaaa tyttcartca tatggtaaaa catgtttaa atttaaaata tttaaaattg 1300  
 tttcaaccc ttgtgttag cgcttgc aa atatcttaac attgtcttgc tttgtttca 1360  
 ttgtgtgcaa ctttcctgaa ttttagaaatt aaattttgc atttatgtta ggtgttctgt 1420  
 aatagatatg acttataatgt gaaaaacttt cataaagaag tcattttcac taatrcagtg 1480  
 actctcactg gtaactgtat tttgtgaaatgc acaaaaactgt ttttagtgctg aatgctataa 1540  
 ggaattttagg ttgttatgaat tctacaatcc tataataaat tttaccatat tcaaaaaaaaaa 1598

<210> 5  
 <211> 263  
 <2> PRT  
 <13> Schwein

<400> 5  
 Met Val Lys Ile Ala Phe Asn Thr Pro Ala Ala Val Gln Lys Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Ala Gln Gln Asp Val Glu Ala Leu Val Ser His Thr Val Arg Ala Gln  
 20 25 30  
 Ile Leu Thr Gly Lys Glu Leu Gln Val Ala Thr Lys Glu Lys Glu Gly  
 35 40 45  
 Phe Ser Gly Arg Cys Met Leu Thr Leu Val Gly Leu Ser Phe Ile Leu  
 50 55 60  
 Ala Gly Leu Ile Val Gly Gly Ala Cys Ile Tyr Lys Tyr Phe Met Pro  
 65 70 75 80  
 Lys Ser Thr Ile Tyr His Gly Glu Met Cys Phe Phe Asp Ser Ala Asp  
 85 90 95  
 Pro Ala Asn Phe Leu Gln Gly Gly Glu Pro Tyr Phe Leu Pro Val Met  
 100 105 110  
 Glu Glu Ala Asp Ile Arg Glu Asp Asp Asn Ile Ala Ile Ile Asp Val  
 115 120 125  
 Pro Val Pro Ser Phe Ser Asp Ser Asp Pro Ala Ala Ile Ile His Asp  
 130 135 140

Phe	Glu	Lys	Gly	Met	Thr	Ala	Tyr	Leu	Asp	Leu	Leu	Leu	Gly	Asn	Cys
145				150						155				160	
Tyr	Leu	Met	Pro	Leu	Asn	Thr	Ser	Ile	Val	Met	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu
										165		170		175	
Val	Glu	Leu	Phe	Gly	Lys	Leu	Ala	Arg	Gly	Lys	Tyr	Leu	Pro	His	Ala
										180		185		190	
Tyr	Val	Val	His	Glu	Asp	Leu	Val	Ala	Val	Glu	Glu	Ile	His	Asp	Val
										195		200		205	
Ser	Asn	Leu	Gly	Ile	Phe	Ile	Tyr	Gln	Leu	Cys	Asn	Asn	Arg	Lys	Ser
										210		215		220	
Phe	Arg	Leu	Arg	Arg	Arg	Asp	Leu	Leu	Leu	Gly	Phe	Asn	Lys	Arg	Ala
										225		230		235	
Ile	Asp	Lys	Cys	Trp	Lys	Ile	Arg	His	Phe	Pro	Asn	Glu	Phe	Ile	Val
										245		250		255	
Glu	Thr	Lys	Ile	Cys	Gln	Glu									
										260					

<210> 6  
 <211> 814  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Klon S231 aus  
 BMEC aus Schweinehirn

<400> 6  
 acatttcattt aggttcattc tggtaaggg gatgttcgag ggtggccac caaattgtct 60  
 gggctgggta taaagcagtt ggcaagcaaa aactatggga tgatgaacct ttcaatwatg 120  
 atttaatgtat cacatgagta tagaaagctg tttttagtgc tgaaacagac ttacctatca 180  
 gatataatcca aaagagatcc tatgttaaaaa agtcagacta tgactggagt gaaccatgt 240  
 ttcccttgct ttttactttg tttctgtgac atttatgttt catgtaaacct gcattatgg 300  
 tgggtggggtt gtcctagtagc tgtattttgg cttcttcttt aataggattt atatttcata 360  
 tabtataattt gtgaatattt tgakacraat gtttataact ctagggcatat aaaaacagat 420  
 tctgattccc ttcaactgtgt gaatgtttc tggaaaaaa atggaggata aatatggata 480  
 ctaatgacac tcatttcata ttaagtttc aatcagttt atttggataa cttgcattta 540  
 tccgagatat tgagctactt tctgataatg catcaagcat ttctaccata actctttcac 600  
 gcaactgaat gttgttaagt atagttttat cttgctttaa tttaacttct taagcaaaaa 660  
 aaaagaaaact tcataagcta atacattaga gaaaggttat gatcttgaat cnagaatggc 720  
 atggcatt aaggaatgag atacttgtaa atttctttg aaacagccaa ctcctctgtt 780  
 gtcttcac aattcaaaaat atatgcctca ctgt 814

<210> 7  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 7  
 ccataaactct ttacacgcaac tg

22

<210> 8  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 8

acaacagagg agttggctgt tt

22

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 9

ggtattgctg gctggatatct tt

22

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 10

atgttaggaat agccgtggtg at

22

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 11

ggtctttgtg ttccagctct tc

22

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 12

ttctcaggac cagatagaga acg

23

<210> 13

<211> 483

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(480)

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Klon S231 aus  
BMEC aus Schweinehirn

&lt;400&gt; 13

atg ttg gtg tta ctg gct ggt atc ttt gtg gtc cac atc gcc act gtc	48
Met Leu Val Leu Leu Ala Gly Ile Phe Val Val His Ile Ala Thr Val	
1 5 10 15	

gtc atg ctg ttc gtt tgc acc att gcc aat gtc tgg gtg gtc tca gat	96
Val Met Leu Phe Val Cys Thr Ile Ala Asn Val Trp Val Val Ser Asp	
20 25 30	

gca gga caa gga tct gtc ggt ctt tgg aaa aac tgt acc agt gct ggc	144
Ala Gly Gln Gly Ser Val Gly Leu Trp Lys Asn Cys Thr Ser Ala Gly	
35 40 45	

tgt act gat acc ctg tta tac ggc ggt gaa gat gcc ctc aag tcg gtg	192
Cys Thr Asp Thr Leu Leu Tyr Gly Gly Glu Asp Ala Leu Lys Ser. Val	
50 55 60	

gag gcc ttc atg atc ctg tct atc ttc tct gtc gtc tcc ctc gtg	240
Ala Phe Met Ile Leu Ser Ile Ile Phe Ser Val Val Ser Leu Val	
65 70 75 80	

gtc ttt gtg ttc cag ctc ttc acc atg gag aaa ggc aac cgc ttc ttc	288
Val Phe Val Phe Gln Leu Phe Thr Met Glu Lys Gly Asn Arg Phe Phe	
85 90 95	

ctc tcg gga gcc acc atg ctg gtg tgc tgg ctg tgc atc atg gtg ggg	336
Leu Ser Gly Ala Thr Met Leu Val Cys Trp Leu Cys Ile Met Val Gly	
100 105 110	

gcc tcc gtc tat act cat cat tat gcc aac agt tct aaa aac caa tac	384
Ala Ser Val Tyr Thr His His Tyr Ala Asn Ser Ser Lys Asn Gln Tyr	
115 120 125	

tcg gcg agt cac cat ggc tat tcc ttc atc ctc gcc tgg atc tgc ttc	432
Ser Ala Ser His His Gly Tyr Ser Phe Ile Leu Ala Trp Ile Cys Phe	
130 135 140	

tc ttc agc ttc atc atc ggc gtt ctc tat ctg gtc ctg aga aag aaa	480
Phe Ser Phe Ile Ile Gly Val Leu Tyr Leu Val Leu Arg Lys Lys	
145 150 155 160	

taa	483
-----	-----

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 160

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Klon S231 aus  
BMEC aus Schweinehirn

&lt;400&gt; 14

Met Leu Val Leu Leu Ala Gly Ile Phe Val Val His Ile Ala Thr Val	
1 5 10 15	

Val Met Leu Phe Val Cys Thr Ile Ala Asn Val Trp Val Val Ser Asp	
20 25 30	

Ala Gly Gln Gly Ser Val Gly Leu Trp Lys Asn Cys Thr Ser Ala Gly  
 35 40 45

Cys Thr Asp Thr Leu Leu Tyr Gly Gly Glu Asp Ala Leu Lys Ser Val  
 50 55 60

Gln Ala Phe Met Ile Leu Ser Ile Ile Phe Ser Val Val Ser Leu Val  
 65 70 75 80

Val Phe Val Phe Gln Leu Phe Thr Met Glu Lys Gly Asn Arg Phe Phe  
 85 90 95

Leu Ser Gly Ala Thr Met Leu Val Cys Trp Leu Cys Ile Met Val Gly  
 100 105 110

Ala Ser Val Tyr Thr His His Tyr Ala Asn Ser Ser Lys Asn Gln Tyr  
 115 120 125

Ser Ala Ser His His Gly Tyr Ser Phe Ile Leu Ala Trp Ile Cys Phe  
 130 135 140

Asp Phe Ser Phe Ile Ile Gly Val Leu Tyr Leu Val Leu Arg Lys Lys  
 145 150 155 160

<210> 15

<211> 513

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Klon S012 aus  
 BMEC aus Schweinehirn

<400> 15

acatagaatt caatcaagtg taattcagaa taatgtgtat attagcatat ttacagtaat 60  
 gggatgtcat cgctattgtt agaatactga catcactttt ctgagcagaa attgaaactg 120  
 taaatattaac ctttaatta tcacctcacc tgaaaagggtt ggttgagata ctcacgcagc 180  
 atgtattata ttaaccatgt catgtttaag ttattaaattt cagattattt ataaacttatt 240  
 tcttagggc ctgcctcatg tcttctaggg tatttgagta atcatcctat atttaaagtt 300  
 aactttga cttaaaaaac actgttaatg aaagttccct agcgcttttc ttattttcaa 360  
 tggtctta tggtagtag tagagaattc catgctgttc tgaggctagc ttccaggtaa 420  
 acagtgattt ttttttctt ttttcttcc tttcttggtg agtggtccag agtttaagc 480  
 tactttctc aaagttcaa ccctttccca ggt 513

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 16

gtatcgggag tggaggatta ca

22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

&lt;400&gt; 17

cccgaggtat atttgttctt gg

22

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 1674

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Schwein

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (40)...(774)

&lt;400&gt; 18

ccgtctgcct ggtcccarag gcgcaccggc ttccgttaac atg ttt gtg gca gct	54
Met Phe Val Ala Ala	
1	5

gg aca ggc cag aga acc ttg aga aag gtg gtc tcg gga tgc cgt cca	102
Arg Thr Gly Gln Arg Thr Leu Arg Lys Val Val Ser Gly Cys Arg Pro	
10	15
20	

aaa tcg gcg aca gcg act gga gtc ccg gct cct gcg cag ggg cct ccg	150
Lys Ser Ala Thr Ala Thr Gly Val Pro Ala Pro Ala Gln Gly Pro Pro	
25	30
35	

cg aac atc aga tac tta gcc tcc tgt ggt ata ctg atg aac aga act	198
Arg Asn Ile Arg Tyr Leu Ala Ser Cys Gly Ile Leu Met Asn Arg Thr	
40	45
50	

ctt cca ctg cat tcc tca ttt ttg cct aag gag atg tat gca aga acc	246
Leu Pro Leu His Ser Ser Phe Leu Pro Lys Glu Met Tyr Ala Arg Thr	
55	60
65	

ttc ttc aga att gct gca cca tta ata aac aaa aga aaa gaa tat tca	294
Phe Phe Arg Ile Ala Ala Pro Leu Ile Asn Lys Arg Lys Glu Tyr Ser	
70	75
80	85

g agg agg att ata gga tat tct atg cag gaa atg tat gac gta gta	342
Glu Arg Arg Ile Ile Gly Tyr Ser Met Gln Glu Met Tyr Asp Val Val	
90	95
100	

tcg gga atg gaa gat tac aag cat ttt gtg cct tgg tgc aaa aaa tca	390
Ser Gly Met Glu Asp Tyr Lys His Phe Val Pro Trp Cys Lys Lys Ser	
105	110
115	

gat gta ata tca agg aga tct gga tac tgc aaa aca cga tta gaa att	438
Asp Val Ile Ser Arg Arg Ser Gly Tyr Cys Lys Thr Arg Leu Glu Ile	
120	125
130	

ggg ttt cca ccc gta ttg gag cgc tat acg tca gta gta acc ttg. gtg	486
Gly Phe Pro Pro Val Leu Glu Arg Tyr Thr Ser Val Val Thr Leu Val	
135	140
145	

aaa cca cat ttg gta aag gca tcc tgt gca gat ggg aag ctc ttt aat	534
Lys Pro His Leu Val Lys Ala Ser Cys Ala Asp Gly Lys Leu Phe Asn	
150	155
160	165

cac tta gag act gtt tgg cgt ttt agc cca ggt ctt cct ggc tac cca 582  
 His Leu Glu Thr Val Trp Arg Phe Ser Pro Gly Leu Pro Gly Tyr Pro  
 170 175 180

aga act tgt act ttg gat ttt tca att tct ttt gaa ttt cga tca ctt 630  
 Arg Thr Cys Thr Leu Asp Phe Ser Ile Ser Phe Glu Phe Arg Ser Leu  
 185 190 195

ctg cac tct cag ctt gcc aca ttg ttt ttt gat gaa gtt gtg aag cag 678  
 Leu His Ser Gln Leu Ala Thr Leu Phe Phe Asp Glu Val Val Lys Gln  
 200 205 210

atg gta gct gct ttt gaa aga aga gca tgt aaa ctg tat ggt cca gaa 726  
 Met Val Ala Ala Phe Glu Arg Arg Ala Cys Lys Leu Tyr Gly Pro Glu  
 215 220 225

aca agt ata cct cgg gaa tta atg ctt cat gaa gtt cat cac aca taa 774  
 Thr Ser Ile Pro Arg Glu Leu Met Leu His Glu Val His His Thr  
 230 235 240 245

gagaaaagga aatgggtgcc tacttgtaac tagtttattc acttttagga agtgctttca 834

tattttgct ytcagaaggc agaaagcatt tgtcaaacac agctttgata taaacctgta 894

ctttgcactt ggaatatgga accacatgta catagaattc aatcaagtgt aattcagaat 954

aatgtgtata ttagcatatt tacagtaatg ggatgtcata gctattgtta gaataactgac 1014

atcacttttc tgagcagaaa ttgaaactgt aaatttaacc ttttaattat cacctcacct 1074

gaaaagggttg gttgagatac tcacgcagca tgtattatat taaccatgtc atgttaagt 1134

tattaaattc agattattta taacttatta tcttagggcc tgcctcatgt cttctagggt 1194

atttgagtaa tcatcctata tttaaagtta aaactttgac ttaaaaaaca ctgttaatga 1254

aagttcccta gcgctttct tattttcaaa ttggctttat ggtagtagt agagaattcc 1314

atgctgttct gaggctagct tccaggtaaa cagtgattt tttttcttt ttttctttct 1374

tcttggtga gtggccaga gtttaagct actttctca aagtttcaac ccttcccag 1434

actttgac tactatttca gtaatgttga ttgtgtgtca agttttgtct acagcagtgg 1494

gcaatagatg aaggaagtgc gttgatatgt ctccaaacacc atgcattctg attttctatt 1554

tattgtgtat actcaacttcc aataatgtat ttccaaactga tattttgtt aacaaatcag 1614

tgttaaggact gaagtggtaa cttaataaaag ttaattgtt taaaaaataa aaaaaaaaaa 1674

<210> 19

<211> 244

<212> PRT

<213> Schwein

<400> 19

Met Phe Val Ala Ala Arg Thr Gly Gln Arg Thr Leu Arg Lys Val Val  
 1 5 10 15

Ser Gly Cys Arg Pro Lys Ser Ala Thr Ala Thr Gly Val Pro Ala Pro  
 20 25 30

Ala Gln Gly Pro Pro Arg Asn Ile Arg Tyr Leu Ala Ser Cys Gly Ile  
 35 40 45

Leu Met Asn Arg Thr Leu Pro Leu His Ser Ser Phe Leu Pro Lys Glu  
 50 55 60  
 Met Tyr Ala Arg Thr Phe Phe Arg Ile Ala Ala Pro Leu Ile Asn Lys  
 65 70 75 80  
 Arg Lys Glu Tyr Ser Glu Arg Arg Ile Ile Gly Tyr Ser Met Gln Glu  
 85 90 95  
 Met Tyr Asp Val Val Ser Gly Met Glu Asp Tyr Lys His Phe Val Pro  
 100 105 110  
 Trp Cys Lys Lys Ser Asp Val Ile Ser Arg Arg Ser Gly Tyr Cys Lys  
 115 120 125  
 Thr Arg Leu Glu Ile Gly Phe Pro Pro Val Leu Glu Arg Tyr Thr Ser  
 130 135 140  
 Val Val Thr Leu Val Lys Pro His Leu Val Lys Ala Ser Cys Ala Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Lys Leu Phe Asn His Leu Glu Thr Val Trp Arg Phe Ser Pro Gly  
 165 170 175  
 Leu Pro Gly Tyr Pro Arg Thr Cys Thr Leu Asp Phe Ser Ile Ser Phe  
 180 185 190  
 Glu Phe Arg Ser Leu Leu His Ser Gln Leu Ala Thr Leu Phe Phe Asp  
 195 200 205  
 Glu Val Val Lys Gln Met Val Ala Ala Phe Glu Arg Arg Ala Cys Lys  
 210 215 220  
 Tyr Gly Pro Glu Thr Ser Ile Pro Arg Glu Leu Met Leu His Glu  
 225 230 235 240  
 Val His His Thr

<210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 20  
 cgcgtggta atgatctgta

20

<210> 21  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 21  
 ctccatgtc aggtcctcca g

21

<210> 22  
 <211> 607  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:partielle  
 CDNA-Sequenz von NSE2 aus Schwein

<220>  
 <221> CDS

&lt;222&gt; (1)..(192)

&lt;400&gt; 22

gag gac ctg atc atg gag aaa cgg cgc aac gac cag ata ggg cgc gcc 48  
 Glu Asp Leu Ile Met Glu Lys Arg Arg Asn Asp Gln Ile Gly Arg Ala  
 1 5 10 15

gcg gtg cta cag gag ctg gcc acg cac ctg cac ccc gcg gag ccg gac 96  
 Ala Val Leu Gln Glu Leu Ala Thr His Leu His Pro Ala Glu Pro Asp  
 20 25 30

gag ggc gac agc gac gcc gcg cgg act acg ccg cct ccc ggg cgc tcc 144  
 Glu Gly Asp Ser Asp Ala Ala Arg Thr Thr Pro Pro Pro Gly Arg Ser  
 35 40 45

cag gcg ccg ggc caa gag gag gac cga gag gcg gtg gtg cac tga 192  
 Gln Ala Pro Gly Gln Glu Glu Asp Arg Glu Ala Val Val His  
 50 55 60

caggcgagct gagtgccggag ctgcgtgagg gagccttcgc agcagccgct gccccctccc 252

tctctccct ccctcctcca ccatcttctg ggtcccaact gggctcctgg gccatggaa 312

aaacggagag ttggcgaaaa gcgcgtccag ctgtggcttg agtttgttat cttggacgga 372

ggaggaagag ggagcagctt ccatggaccc ctgatcacta cttgaggaga atttcctgt 432

ggattcaact gactagctat tgtatgtaa gcagtttgag gtgactggcc cagcaggagt 492

gagaagaatt tatcttcagc ataaacttca ttattctaca gtgtttcttc atttgcctga 552

gaggttaagga tgctatgttag acagaaacaa aggaagaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 607

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 63

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:partielle  
CDNA-Sequenz von NSE2 aus Schwein

&lt;200&gt; 23

u Asp Leu Ile Met Glu Lys Arg Arg Asn Asp Gln Ile Gly Arg Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Val Leu Gln Glu Leu Ala Thr His Leu His Pro Ala Glu Pro Asp  
 20 25 30  
 Glu Gly Asp Ser Asp Ala Ala Arg Thr Thr Pro Pro Pro Gly Arg Ser  
 35 40 45  
 Gln Ala Pro Gly Gln Glu Glu Asp Arg Glu Ala Val Val His  
 50 55 60

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

&lt;400&gt; 24

cgagaccctg tggggctta ttac

<210> 25  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 25  
 ctggtgttatt agctggagcg tgtg

24

<210> 26  
 <211> 586  
 <212> DNA  
 <213> Schwein

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(585)

<400> 26  
 cga gac cct gtg gtg gct tat tac tgt cgt tta tat gca atg caa act 48  
 Arg Asp Pro Val Val Ala Tyr Tyr Cys Arg Leu Tyr Ala Met Gln Thr  
 1 5 10 15

gga atg aag att gat agt aaa act cct gaa tgt cgt aaa ttt tta tca 96  
 Gly Met Lys Ile Asp Ser Lys Thr Pro Glu Cys Arg Lys Phe Leu Ser  
 20 25 30

aag ctg atg gat cag tta gaa gct ctt aag aaa cag ttg ggt gac aat 144  
 Lys Leu Met Asp Gln Leu Glu Ala Leu Lys Lys Gln Leu Gly Asp Asn  
 35 40 45

gaa gct gtt act caa gaa ata gtt ggt tct gcc cac ttg gag aat tat 192  
 Glu Ala Val Thr Gln Glu Ile Val Gly Ser Ala His Leu Glu Asn Tyr  
 50 55 60

gct ttg aaa atg ttt tta tat gca gat aat gaa gat cgg gct ggg cga 240  
 Leu Lys Met Phe Leu Tyr Ala Asp Asn Glu Asp Arg Ala Gly Arg  
 55 70 75 80

ttt cat aaa aac atg atc aag tcc ttc tat act gca agt ctt tta ata 288  
 Phe His Lys Asn Met Ile Lys Ser Phe Tyr Thr Ala Ser Leu Leu Ile  
 85 90 95

gat gtc ata aca gtg ttt gga gaa ctc act gat gaa aat gtg aaa cac 336  
 Asp Val Ile Thr Val Phe Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asn Val Lys His  
 100 105 110

aga aag tat gca agg tgg aag gca aca tat att cat aat tgt tta aag 384  
 Arg Lys Tyr Ala Arg Trp Lys Ala Thr Tyr Ile His Asn Cys Leu Lys  
 115 120 125

aat gga ggg act cct caa gca ggt cct gtg ggc att gaa gaa gat aat 432  
 Asn Gly Gly Thr Pro Gln Ala Gly Pro Val Gly Ile Glu Glu Asp Asn  
 130 135 140

gac ata gaa gaa aat gaa gat gct gga gca acc tot ctg ccc act cag 480  
 Asp Ile Glu Glu Asn Glu Asp Ala Gly Ala Thr Ser Leu Pro Thr Gln  
 145 150 155 160

cca cct cag cca tca tct tcc act tat gac cca ggc aac atg cca tcg 528  
 Pro Pro Gln Pro Ser Ser Ser Thr Tyr Asp Pro Gly Asn Met Pro Ser  
 165 170 175

agc agc tat act gga ata cag att cct ccc ggt gca cac gct cca gct 576  
 Ser Ser Tyr Thr Gly Ile Gln Ile Pro Pro Gly Ala His Ala Pro Ala  
 180 185 190

aat aca cca g 586  
 Asn Thr Pro  
 195

<210> 27  
 <211> 195  
 <212> PRT  
 <213> Schwein

<400> 27  
 Arg Asp Pro Val Val Ala Tyr Tyr Cys Arg Leu Tyr Ala Met Gln Thr  
 1 5 10 15

Gly Met Lys Ile Asp Ser Lys Thr Pro Glu Cys Arg Lys Phe Leu Ser  
 20 25 30

Lys Leu Met Asp Gln Leu Glu Ala Leu Lys Lys Gln Leu Gly Asp Asn  
 35 40 45

Glu Ala Val Thr Gln Glu Ile Val Gly Ser Ala His Leu Glu Asn Tyr  
 50 55 60

Ala Leu Lys Met Phe Leu Tyr Ala Asp Asn Glu Asp Arg Ala Gly Arg  
 65 70 75 80

Phe His Lys Asn Met Ile Lys Ser Phe Tyr Thr Ala Ser Leu Leu Ile  
 85 90 95

Asp Val Ile Thr Val Phe Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asn Val Lys His  
 100 105 110

Gly Lys Tyr Ala Arg Trp Lys Ala Thr Tyr Ile His Asn Cys Leu Lys  
 115 120 125

Asn Gly Gly Thr Pro Gln Ala Gly Pro Val Gly Ile Glu Glu Asp Asn  
 130 135 140

Asp Ile Glu Glu Asn Glu Asp Ala Gly Ala Thr Ser Leu Pro Thr Gln  
 145 150 155 160

Pro Pro Gln Pro Ser Ser Ser Thr Tyr Asp Pro Gly Asn Met Pro Ser  
 165 170 175

Ser Ser Tyr Thr Gly Ile Gln Ile Pro Pro Gly Ala His Ala Pro Ala  
 180 185 190

Asn Thr Pro  
 195

<210> 28  
 <211> 20

<212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer  
  
 <400> 28  
 aaaaggcccc cagggttacg 20

<210> 29  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer  
  
 <400> 29  
 ggagtgggca gcaggtgagc 20

<210> 30  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer  
  
 <400> 30  
 ttaacctgca cagcgacaag t 21

<210> 31  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer  
  
 <400> 31  
 ctgctgaaga tctcacgctt c 21

<210> 32  
 <211> 1194  
 <212> DNA  
 <213> Schwein  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(741)  
  
 <400> 32  
 acg gac gag gag ctc cgc agg cgc cag ctg act tgc acc gag gag atg 48  
 Thr Asp Glu Glu Leu Arg Arg Arg Gln Leu Thr Cys Thr Glu Glu Met  
 1 5 10 15

gcc cag cga ggg ctg cct gcc ctt gac ccc tgg gag ccg aag gcg 96  
 Ala Gln Arg Gly Leu Pro Pro Ala Leu Asp Pro Trp Glu Pro Lys Ala  
 20 25 30

gac tgg gcg ccc gca ggc agc ctc agc ggt gag gcc ggc cag aag gat	144
Asp Trp Ala Pro Ala Gly Ser Leu Ser Gly Glu Ala Gly Gln Lys Asp	
35 40 45	
gtc aac ggg ccc ctg agg gag ctg cgc cca agg ctc tgc cac ctg cga	192
Val Asn Gly Pro Leu Arg Glu Leu Arg Pro Arg Leu Cys His Leu Arg	
50 55 60	
aaa ggc ccc cag ggt tac ggg ttt aac ctg cac agc gac aag tcc cgg	240
Lys Gly Pro Gln Gly Tyr Gly Phe Asn Leu His Ser Asp Lys Ser Arg	
65 70 75 80	
cct gga cag tac atc cgc tcc gtg gac cca ggc tca cct gct gcc cac	288
Pro Gly Gln Tyr Ile Arg Ser Val Asp Pro Gly Ser Pro Ala Ala His	
85 90 95	
tcc ggc ctc cga gcc cag gac cga ctc ata gag gtg aac ggg cag aat	336
Ser Gly Leu Arg Ala Gln Asp Arg Leu Ile Glu Val Asn Gly Gln Asn	
100 105 110	
tg gag ggg ctg cgg cac gcg gag gtg gtt gcc tgc atc aag gcg cgg	384
Glu Gly Leu Arg His Ala Glu Val Val Ala Cys Ile Lys Ala Arg	
115 120 125	
gag gac gag gcc cgg ctg ctg gtg gac ccc gag acg gat gtg tac	432
Glu Asp Glu Ala Arg Leu Leu Val Val Asp Pro Glu Thr Asp Val Tyr	
130 135 140	
ttc aag cgg ctg cgg gtc aca ccc acc cag gag cac atg gaa ggt cca	480
Phe Lys Arg Leu Arg Val Thr Pro Thr Gln Glu His Met Glu Gly Pro	
145 150 155 160	
ctg tca tca cct gtc acc aat ggg acc agc tca gcc cag ctc aat ggt	528
Leu Ser Ser Pro Val Thr Asn Gly Thr Ser Ser Ala Gln Leu Asn Gly	
165 170 175	
ggc tcc gtg tgc tcg tcc cga agt gac ctg ccc ggc tta gac aag gac	576
Gly Ser Val Cys Ser Ser Arg Ser Asp Leu Pro Gly Leu Asp Lys Asp	
180 185 190	
gag gac agc agc acc tgg aag cgt gac cct ttc cag gag agt ggc	624
Glu Asp Ser Ser Thr Trp Lys Arg Asp Pro Phe Gln Glu Ser Gly	
195 200 205	
ctc cac ctg agc ccc acg gcg gct ggg gcc aag gag aag gcg agg gcc	672
Leu His Leu Ser Pro Thr Ala Ala Gly Ala Lys Glu Lys Ala Arg Ala	
210 215 220	
acc agg gtc aac aag cgg gcg cca cag atg gac tgg aac cgg aag cgt	720
Thr Arg Val Asn Lys Arg Ala Pro Gln Met Asp Trp Asn Arg Lys Arg	
225 230 235 240	
-gag atc ttc agc aac ttc tga gaccccccac cctccgcccgc agccgcccgc	771
Glu Ile Phe Ser Asn Phe	
245	
tggtccccag ccgggcctcc tctggcatg gaccttggc cttgcccaga gcgcggcag 831	
cctcagtggc ctgcagcggg ggcaccttcg ctgcctaagc cgtggtggtc ccaccacccc 891	
ccatgaacca gcccgtgccc cagtgagccc ccgtccgtcc acgggtgctgg 951	

gggaggggag gttggggtaa cccgccaggc cgggccttg ctgctctgcc tgggcctgct 1071

ttccacttaa taccagagcc cccaccccca tcccctcagg acgtgctctc taaataattg 1191

caa 1194

<210> 33

<211> 246

<212> PRT

<213> Schwein

<400> 33

Thr Asp Glu Glu Leu Arg Arg Gln Leu Thr Cys Thr Glu Glu Met  
 1 5 10 15  
 Ala Gln Arg Gly Leu Pro Pro Ala Leu Asp Pro Trp Glu Pro Lys Ala  
 20 25 30  
 Asp Trp Ala Pro Ala Gly Ser Leu Ser Gly Glu Ala Gly Gln Lys Asp  
 35 40 45  
 Val Asn Gly Pro Leu Arg Glu Leu Arg Pro Arg Leu Cys His Leu Arg  
 50 55 60  
 Lys Gly Pro Gln Gly Tyr Gly Phe Asn Leu His Ser Asp Lys Ser Arg  
 65 70 75 80  
 Pro Gly Gln Tyr Ile Arg Ser Val Asp Pro Gly Ser Pro Ala Ala His  
 85 90 95  
 Ser Gly Leu Arg Ala Gln Asp Arg Leu Ile Glu Val Asn Gly Gln Asn  
 100 105 110  
 Val Glu Gly Leu Arg His Ala Glu Val Val Ala Cys Ile Lys Ala Arg  
 115 120 125  
 Glu Asp Glu Ala Arg Leu Leu Val Val Asp Pro Glu Thr Asp Val Tyr  
 130 135 140  
 Phe Lys Arg Leu Arg Val Thr Pro Thr Gln Glu His Met Glu Gly Pro  
 145 150 155 160  
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Asn Gly Thr Ser Ser Ala Gln Leu Asn Gly  
 165 170 175  
 Gly Ser Val Cys Ser Ser Arg Ser Asp Leu Pro Gly Leu Asp Lys Asp  
 180 185 190  
 Thr Glu Asp Ser Ser Thr Trp Lys Arg Asp Pro Phe Gln Glu Ser Gly  
 195 200 205  
 21 His Leu Ser Pro Thr Ala Ala Gly Ala Lys Glu Lys Ala Arg Ala  
 210 215 220  
 Thr Arg Val Asn Lys Arg Ala Pro Gln Met Asp Trp Asn Arg Lys Arg  
 225 230 235 240  
 Glu Ile Phe Ser Asn Phe  
 245

<210> 34

<211> 63

<212> PRT

<213> Schwein

<400> 34

Glu Asp Leu Ile Met Glu Lys Arg Arg Asn Asp Gln Ile Gly Arg Ala  
 1 5 10 15

Ala Val Leu Gln Glu Leu Ala Thr His Leu His Pro Ala Glu Pro Asp  
 20 25 30

Glu Gly Asp Ser Asp Ala Ala Arg Thr Thr Pro Pro Pro Gly Arg Ser  
35 40 45

Gln Ala Pro Gly Gln Glu Glu Asp Arg Glu Ala Val Val His  
50 55 60

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Identifizierung der Anwesenheit eines BHS-spezifischen Proteins oder Fragments davon in Hirnkapillar-Endothelzellen, dadurch gekennzeichnet, dass man
  - a) frisch aus dem Gehirn isolierte Hirnkapillar-Endothelzellen durch enzymatischen Aufschluss in üblicher Weise vorreinigt,
  - b) den in Stufe a) erhaltenen Aufschluss mit einem Lysebuffer behandelt, der vorhandene Erythrozyten und apoptotische Zellen im Wesentlichen zerstört und wenigstens 70% der Hirnkapillar-Endothelzellen in vitaler Form erhält,
  - c) gegebenenfalls das in Stufe b) erhaltene Produkt weiter aufreinigt,
  - d) eine subtraktive cDNA-Bank aus den Hirnkapillar-Endothelzellen und einem Subtraktionsgewebe herstellt,
  - e) eine cDNA-Subtraktion mittels einer oder mehrerer differentieller Hybridisierungen durchführt,
  - f) Klone aus der subtraktiven cDNA-Bank durch differentielle Hybridisierung hinsichtlich ihrer jeweiligen Expression verifiziert,
  - g) zu den BHS-spezifischen Klonen aus der subtraktiven cDNA-Bank die cDNA-Sequenz ergänzt und
  - h) das Expressionsmuster der untersuchten Klone zwischen frischen und kultivierten Hirnkapillar-Endothelzellen

vergleicht und so die Anwesenheit BHS-spezifischer Proteine oder Fragmente davon identifiziert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Lysepuffer in Stufe b) die folgende Zusammensetzung besitzt:

Na <sup>+</sup>	30,0 mM bis	60,0 mM
K <sup>+</sup>	5,0 mM bis	7,5 mM
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	80,0 mM bis	100,0 mM
Ca <sup>2+</sup>	1,0 mM bis	2,0 mM
Mg <sup>2+</sup>	6,0 mM bis	9,0 mM
Cl <sup>-</sup>	125,0 mM bis	175,0 mM
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,5 mM bis	6,5 mM
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0,5 mM bis	2,5 mM
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,3 mM bis	0,6 mM
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,4 mM bis	0,7 mM
Glukose	1,5 mM bis	3,0 mM

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Lysepuffer die folgende Zusammensetzung besitzt:

NaCl	30 mM	bis	50 mM
KCl	4,5 mM	bis	5,5 mM
NH <sub>4</sub> Cl	80 mM	bis	100 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,0 mM	bis	2,0 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,6 mM	bis	0,8 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,3 mM	bis	0,6 mM
NaHCO <sub>3</sub>	4,5 mM	bis	6,5 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 mM	bis	0,45 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4 mM	bis	0,65 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 mM	bis	0,15 mM
Glucose	1,5 mM	bis	3,0 mM

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch  
gekennzeichnet, dass das Subtraktionsge-  
webe in Stufe f) Aortenendothelzellen sind.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch  
gekennzeichnet, dass man die vollständige  
cDNA-Sequenz in Stufe i) durch Durchmustern von cDNA-  
Banken und RACE-PCR erstellt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch  
gekennzeichnet, dass die Hirnkapillar-  
Endothelzellen aus dem Menschen oder dem Schwein stammen.  
10
7. Protein mit BHS-Spezifität oder ein Fragment davon, er-  
hältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1  
bis 6.

8. Protein nach Anspruch 7, dadurch ~~gekennzeichnet~~, dass es die Sequenz SEQ ID NO:5 besitzt.
9. Protein nach Anspruch 7, dadurch ~~gekennzeichnet~~, dass es die Sequenz SEQ ID NO:14 besitzt.  
5
10. Protein nach Anspruch 7, dadurch ~~gekennzeichnet~~, dass es die Sequenz SEQ ID NO 19 besitzt.
11. Verfahren zur Identifizierung der Anwesenheit eines BHS-spezifischen Proteins oder Fragments davon in Hirnkapillar-Endothelzellen, dadurch ~~gekennzeichnet~~, dass man  
15

  - a) frisch aus dem Gehirn isolierte Hirnkapillar-Endothelzellen durch enzymatischen Aufschluss in üblicher Weise vorreinigt,
  - b) den in Stufe a) erhaltenen Aufschluss mit einem Lyse-puffer behandelt, der vorhandene Erythrozyten und apoptotische Zellen im Wesentlichen zerstört und wenigstens 70% der Hirnkapillar-Endothelzellen in vitaler Form erhält,  
20
  - c) gegebenenfalls das in Stufe b) erhaltene Produkt weiter aufreinigt,
  - d) das in Stufe c) erhaltene Produkt in einem geeigneten Puffer solubilisiert,  
25
  - e) eine isoelektrische Fokussierung durchführt,

- f) die Proben aus der isoelektrischen Fokussierung in der zweiten Dimension nach Molekulargewicht auftrennt,
- g) differentielle Spots identifiziert und isoliert,
- 5 h) mit dem Isolat von g) eine massenspektrometrische Analyse durchführt, und
- i) hiervon eine Auswertung mittels gezielter Datenbankanalyse vornimmt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch ~~g e k e n n -~~  
~~z e i c h n e t~~, dass der Lysepuffer in Stufe b) die folgende Zusammensetzung besitzt:

Na <sup>+</sup>	30,0 mM bis	60,0 mM
K <sup>+</sup>	5,0 mM bis	7,5 mM
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	80,0 mM bis	100,0 mM
Ca <sup>2+</sup>	1,0 mM bis	2,0 mM
Mg <sup>2+</sup>	6,0 mM bis	9,0 mM
Cl <sup>-</sup>	125,0 mM bis	175,0 mM
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,5 mM bis	6,5 mM
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0,5 mM bis	2,5 mM
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,3 mM bis	0,6 mM
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,4 mM bis	0,7 mM
Glukose	1,5 mM bis	3,0 mM

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Lysepuffer die folgende Zusammensetzung besitzt:

5

NaCl	30 mM	bis	50 mM
KCl	4,5 mM	bis	5,5 mM
NH <sub>4</sub> Cl	80 mM	bis	100 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,0 mM	bis	2,0 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,6 mM	bis	0,8 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,3 mM	bis	0,6 mM
NaHCO <sub>3</sub>	4,5 mM	bis	6,5 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 mM	bis	0,45 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4 mM	bis	0,65 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 mM	bis	0,15 mM
Glucose	1,5 mM	bis	3,0 mM

14. Protein mit BHS-Spezifität oder ein Fragment davon, erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13.

10 15. Protein nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass es die Sequenz SEQ ID NO 23 besitzt.

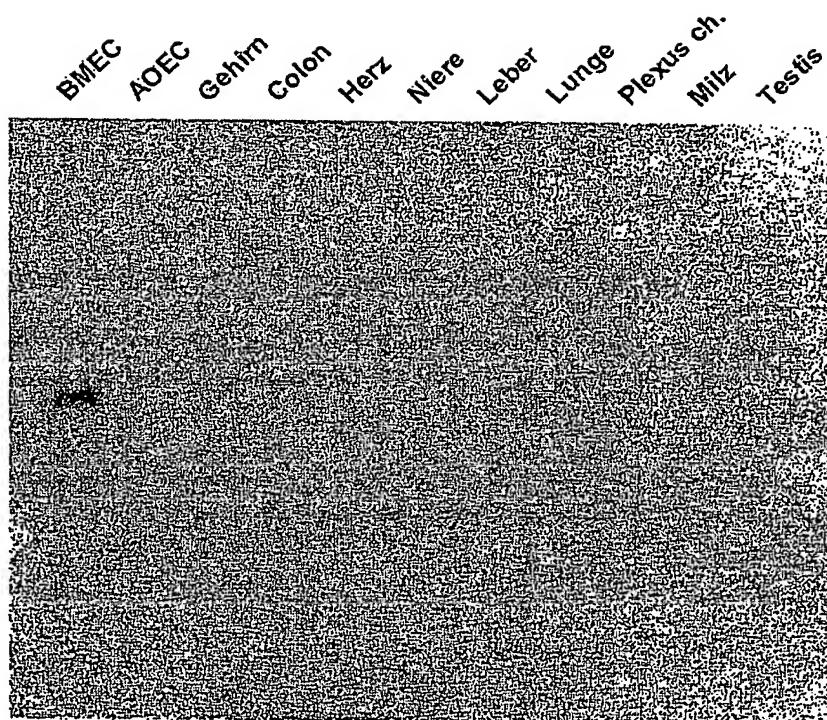
15 16. Protein nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass es die Sequenz SEQ ID NO 27 besitzt.

17. Protein nach Anspruch 14, dadurch g e k e n n -  
z e i c h n e t, dass es die Sequenz SEQ ID NO 33 be-  
sitzt.
18. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 7 bis  
5 10 oder 14 bis 17 zur Herstellung eines Medikaments zum  
Transport von Substanzen durch die Blut-Hirn-Schranke.
19. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 7 bis  
10 oder 14 bis 17 zur Herstellung eines Mittels oder Me-  
dikaments zur Diagnose oder Therapie von Erkrankungen,  
die auf einer Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke beruhen.
20. Mittel zur Diagnose von Erkrankungen, die auf einer Dys-  
funktion der Blut-Hirn-Schranke beruhen, dadurch g e -  
k e n n z e i c h n e t, dass es ein Protein nach einem  
der Ansprüche 7 bis 10 oder 14 bis 17 umfasst.
- 15 21. Mittel zur Therapie von Erkrankungen, die auf einer Dys-  
funktion der Blut-Hirn-Schranke beruhen, dadurch g e -  
k e n n z e i c h n e t, dass es ein Protein nach einem  
der Ansprüche 7 bis 10 oder 14 bis 17 umfasst.

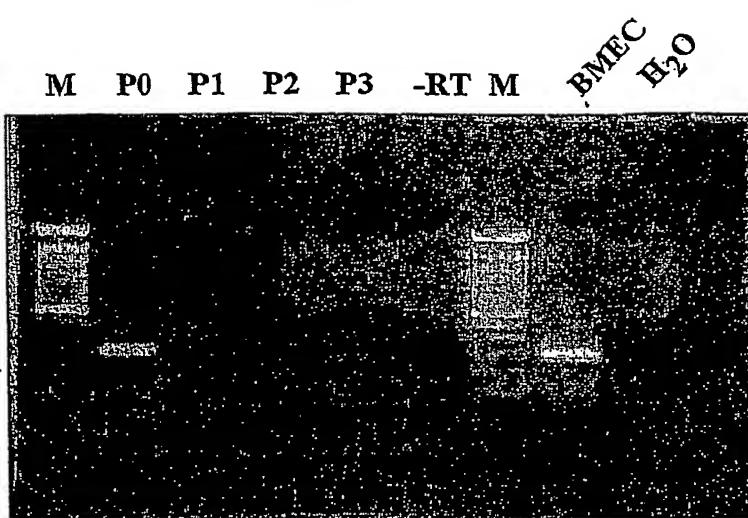
### ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung der Anwesenheit eines BHS-spezifischen Proteins oder Fragments davon in Hirnkapillar-Endothelzellen, dadurch gekennzeichnet, dass man a) frisch aus dem Gehirn isolierte Hirnkapillar-Endothelzellen durch enzymatischen Aufschluss in üblicher Weise vorreinigt, b) den in Stufe a) erhaltenen Aufschluss mit einem Lysepuffer behandelt, der vorhandene Erythrozyten und apoptotische Zellen im Wesentlichen zerstört und wenigstens 5 70% der Hirnkapillar-Endothelzellen in vitaler Form erhält, c) gegebenenfalls das in Stufe b) erhaltene Produkt weiter aufreinigt, d) eine subtraktive cDNA-Bank aus den Hirnkapillar-Endothelzellen und einem Subtraktionsgewebe herstellt, e) eine 10 cDNA-Subtraktion mittels einer oder mehrerer differentieller Hybridisierungen durchführt, f) Klone aus der subtraktiven cDNA-Bank durch differentielle Hybridisierung hinsichtlich ihrer jeweiligen Expression verifiziert, g) zu den BHS-spezifischen Klonen aus der subtraktiven cDNA-Bank eine vollständige cDNA-Sequenz erstellt und h) das Expressionsmuster 15 der untersuchten Klone zwischen frischen und kultivierten Hirnkapillar-Endothelzellen vergleicht und so die Anwesenheit BHS-spezifischer Proteine oder Fragmente davon identifiziert sowie die mit diesem Verfahren identifizierten Proteine und Fragmente davon. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur 20 Identifizierung der Anwesenheit eines BHS-spezifischen Proteins oder Fragments davon in Hirnkapillar-Endothelzellen, dadurch gekennzeichnet, dass man a) frisch aus dem Gehirn isolierte Hirnkapillar-Endothelzellen durch enzymatischen Aufschluss in üblicher Weise vorreinigt, b) den in Stufe a) 25 erhaltenen Aufschluss mit einem Lysepuffer behandelt, der vorhandene Erythrozyten und apoptotische Zellen im Wesentlichen zerstört und wenigstens 70% der Hirnkapillar- 30

Endothelzellen in vitaler Form erhält, c) gegebenenfalls das in Stufe b) erhaltene Produkt weiter aufreinigt, d) das in Stufe c) erhaltene Produkt in einem geeigneten Puffer solumbliisiert, e) eine isoelektrische Fokussierung durchführt, f) die Proben aus der isoelektrischen Fokussierung in der zweiten Dimension nach Molekulargewicht auftrennt, g) differentielle Spots identifiziert und isoliert, h) mit dem Isolat von f) eine massenspektrometrische Analyse durchführt, und i) hiervon eine Auswertung mittels gezielter Datenbankanalyse vornimmt, sowie die mit diesem Verfahren identifizierten Proteine und Fragmente davon. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der so isolierten Proteine oder Fragmente zur Herstellung eines Medikaments zum Transport von Substanzen durch die Blut-Hirn-Schranke, sowie zur Therapie und Diagnose von Erkrankungen, die auf einer Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke beruhen.

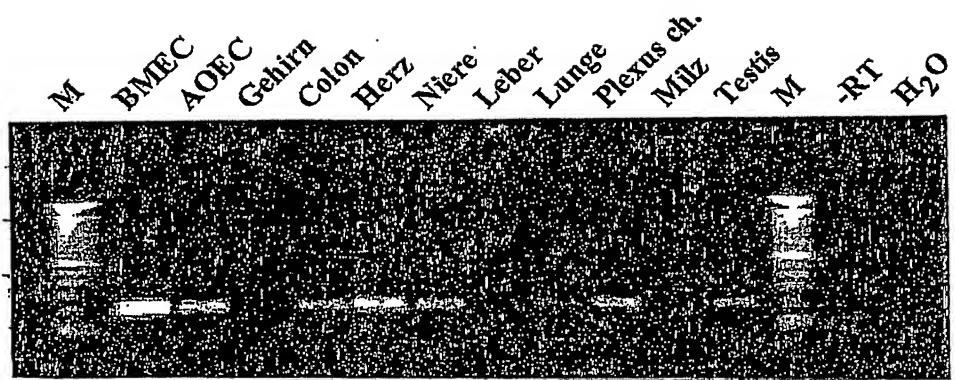


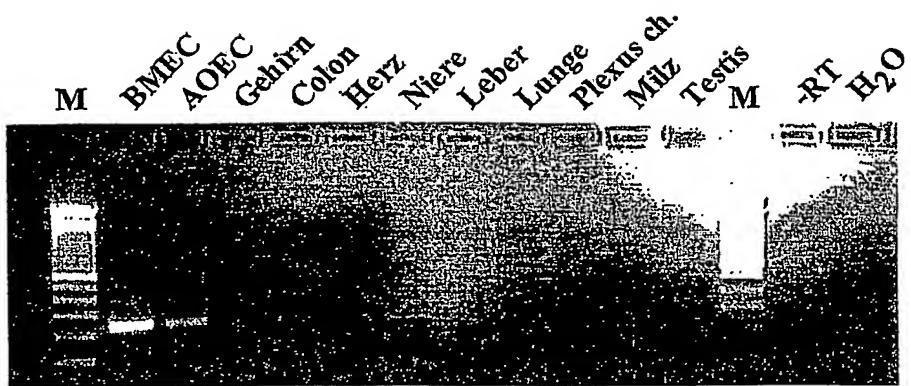
**Figur 1**



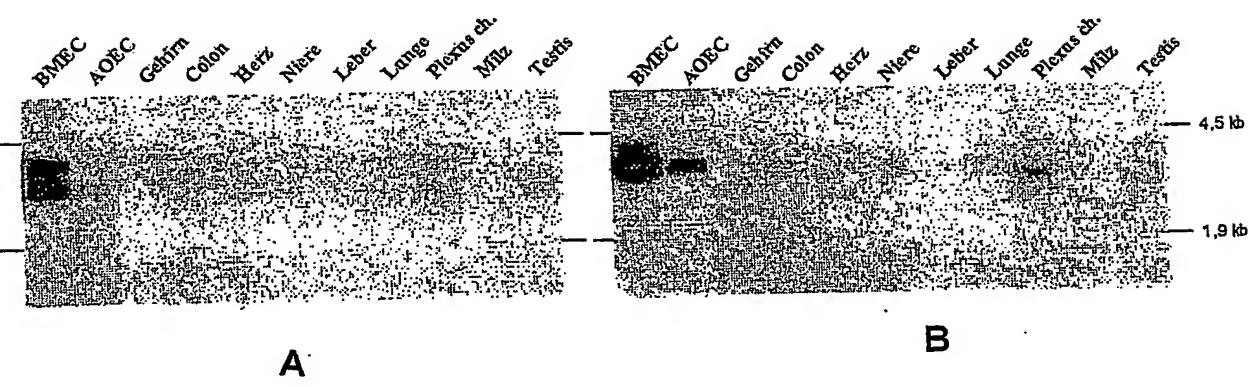
**Figur 2**

**Figur 3**





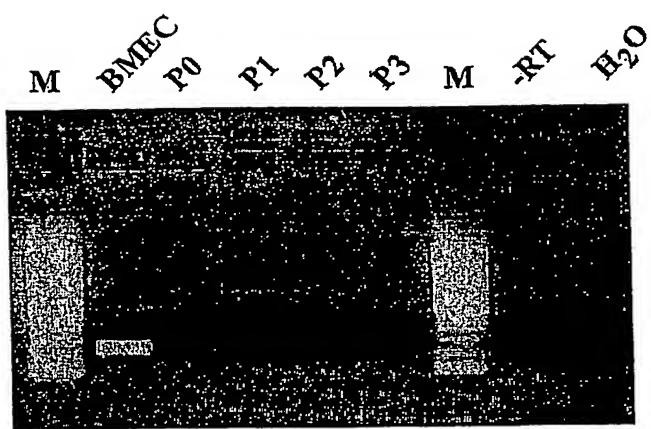
**Figur 4**



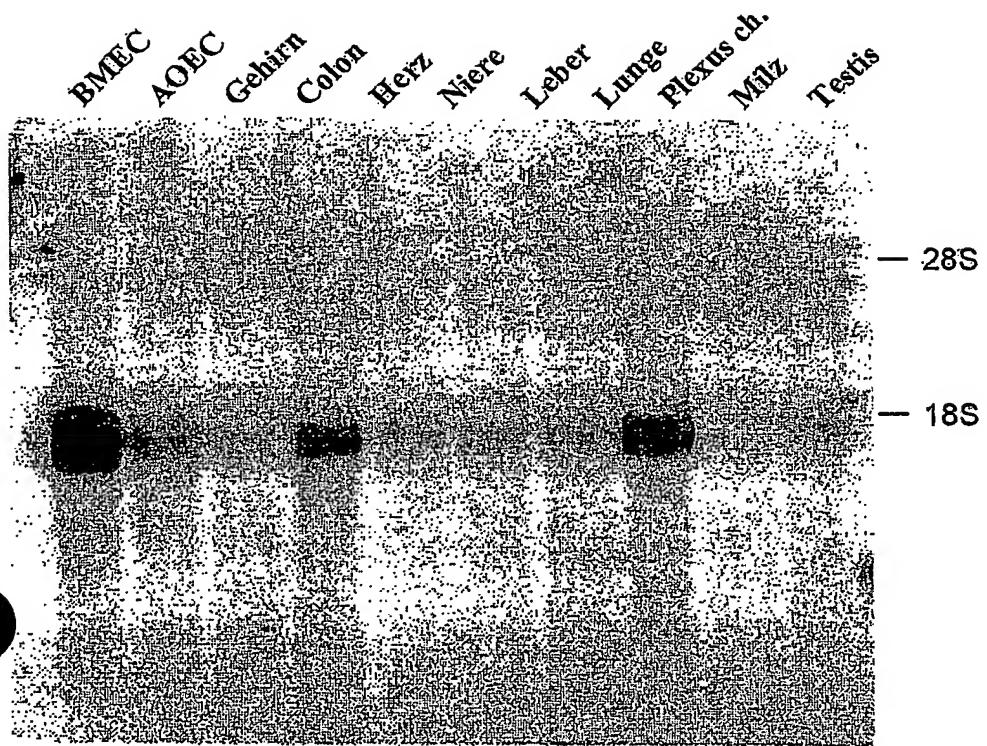
**Figur 5**

Human	MLVLLAGIFVVHIATVIMLFVSTIANWLVSNLVDASVGLWKNTCNISCSDSL	60
Schwein	MLVLLAGIFVVHIATVVMLFVCTIANWVVSAGQGSVGLWKNTSAGCTDILLYGGEDA	60
Maus	MLVLLAGLFLVVHIATAIMLFVSTIANWVADYANASVGLWKNTGGNCDSLSYGNEDA	60
	***** : ***** : ***** : * : : ***** : . * . : * . . ***	
Human	LKTVQAFMILSIIFCVIALLWVFVQQLFTMEKGNNRFFLSGATTLVCWLICLGVGSIYTS	120
Schwein	LKSVQAFMILSIIFSVVSLLVVVFVQQLFTMEKGNNRFFLSGATMLVCWLICMVGASVYTH	120
Maus	IKAVQAFMILSIIIPSIISLWVVFVQQLFTMEKGNNRFFLSGSTMVCWLICLGVGSIYTH	120
	: * : ***** : * : : * : ***** : * : ***** : * : ***** : *** . : * : ***	
Human	ANRDGTQY---HHGYSYILGWICFCFSPIIGVLYLVLRK	157
Schwein	ANSSKNOYSASHHGYSFILAWICFCFSPIIGVLYLVLRK	160
Maus	AHSEGNFNSSSHQGYCFILTWCFCFSPIIGILYMLVRKK	160
	* : . . . * : * . : * : ***** : * : *****	

Figur 6



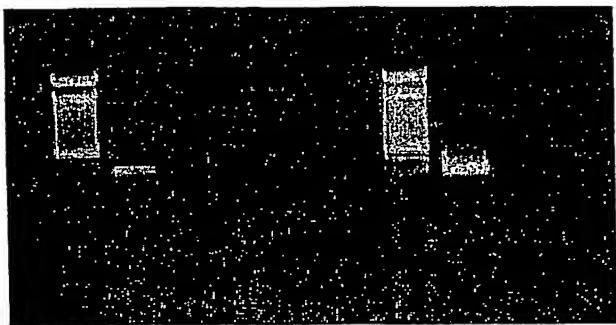
**Figur 7**



**Figur 8**

Figur 9

M P0 P1 P2 P3 -RT M BMEC H<sub>2</sub>O

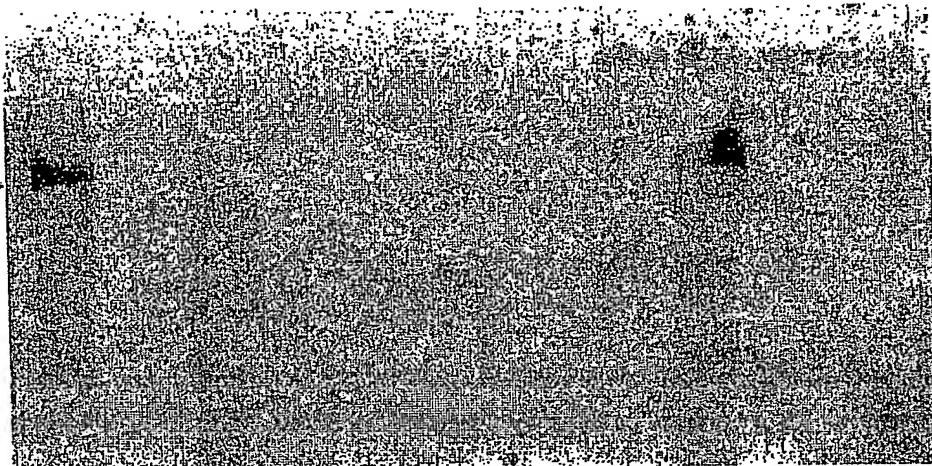


**Figur 10**

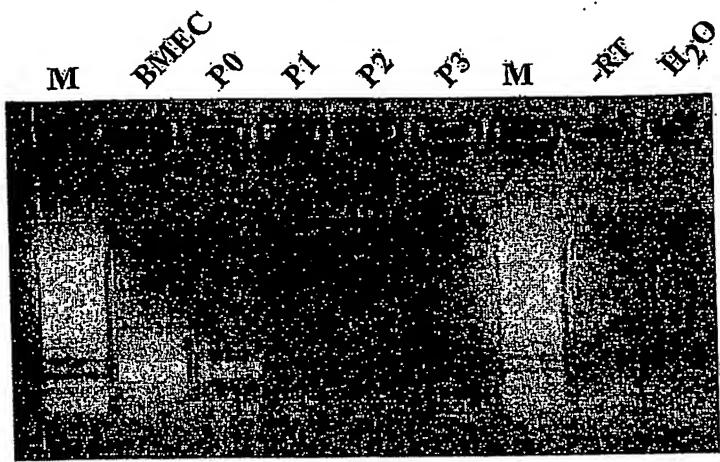
MGNQVEKLTH	<u>LSYKEVPTAD</u>	<u>PTGVDRDDGP</u>	<u>RIGVSYIFSN</u>	DDDEDVEPQPP
PQGPDGGLP	DGGDG <del>PPP</del> PQ	PQPYD <del>PRL</del> HE	<u>VECSVFYRDE</u>	<u>CIYQKSFAPG</u>
<u>SAALSTYTPE</u>	<u>NLLNKCKPGD</u>	LVEFVSQAQY	PHWAVYVGNF	QVVHLHRLEV
INSFLTDASQ	GRRGRVVNDL	<u>YRYKPLSSA</u>	VVRNALAHVG	<u>AKERELSWRN</u>
<u>SESFAAWCRY</u>	GKREFKIGGE	<u>LRIGKQPYRL</u>	<u>QIQLSAQRSH</u>	<u>TLEFQSLEDL</u>
<u>IMEKRRNDQI</u>	GRAAVLQELA	THLHPAEPEE	GDSNVARTTP	PPGRPPAPSS
EEEDGEAVAH				

Figur 11

BMEC AOEC Gehirn Colon Herz Niere Leber Lunge Plexus ch. Milz Testis



**Figur 12**



**Figur 13**

NSE2	MGNQVEKLTHL <del>S</del> KEVPTADPTGVDRDDGPRIGVSYIFSNDDEDVEPQPPQGPDDGGGLP 60
NSE1	MGNQLDRITHLNYS <del>EL</del> PTGDPGIEKDE-LRVGVAYFFSDDEEDLDERGQPDKGVKAPP 59
*****:***.*.*:***:***. *:***:***:***: : *: . . *	
NSE2	DGGDGPPPPQQPQ---YDPRLHEVECSVFYRDEC <del>I</del> YOK-SFAPGSAALSTYTPENLLNK 115
NSE1	GCTPCPESPSRHQHLLLHQLVLNETQFSAFRGQECIFSKVSGGPQGADL3VYAVTALPAL 119
* .*. : : : *.* :***:.* * .* .* **.*: *	
NSE2	CKPGDLVEFVS-----QAQYPHWAVYVGNFQVVHLHRLEVIN <del>S</del> FLTDASQGRRGRVNN 168
NSE1	CEPGDLLELLWLQPAPEPPAPAPHWAVYVGGQIIHLHQGEIRQDSL <del>Y</del> EAAGAANVGRVNN 179
*:*****:***: * *****: ***: *: : . * :* . . *****	
NSE2	DL <del>Y</del> RYKPLSSSAVVRNALAHVGAKERELSWRNSESFAAWCRYGKREFKIGGELRIGKQP- 227
NSE1	SW <del>Y</del> RYRPLVAELVVQNACGHLGLKSEEICWTN3ESFAAWCRFGKREFKAGGEVPAGTQPP 239
. ***:*** : . **:*** .*:***.*:***:*****:***** ***: *.*	
NSE2	---YRLQIQLSAQRSH <del>T</del> LEFQSLEDLIMEKRRNDQIGRAAVLQELATHLHPAEPEEGDSN 284
NSE1	QQQYYLK <del>V</del> HLENK <del>V</del> H <del>T</del> ARPHSLEDLIREKRRIDASGRLRV <del>L</del> QELADLVDDKE----- 292
* *:***: : ** .*:***** *** * ** ***** : * . . . .	
NSE2	VAR <del>T</del> PPPGRPPAP <del>S</del> EEEDGEAVAH 310
NSE1	----- : : . . . . . . . . . .

Figur 14

MGNQVEKLTHLSYKEVP IADPTGVDRDDGPRIGVSYIFSNDDEDVEPQPP 50

+++++-----+-----+

PQGPDPGGGLPDGGDPPPPQQPYDPRLHEVECSVFYRDECIFYQKSFAPG 100

+++++-----+-----+

SAALSTYTPENLINKCKPGDLVEFVSQAQYPHWAVYVGNFQVVHLHRLEV 150

-----+-----+

INSFLTDASQGRRGRVVNDLYRYKPLSSSAVVRNALAHVGAKERELSWRN 200

SESFAAWCRYGKREFKIGGELRIGKQPYRLQIQLSAQRSHTLEFQSLEDL 250

IMEKRRNDQIGRAVLQELATHLHPAEPPEEGDSNVARTTPPPGRPPAPSS 300

+++++-----+-----+

EEEDGEAVAH 310

+++++-----+

possible PEST sequences  
----- poor PEST sequences

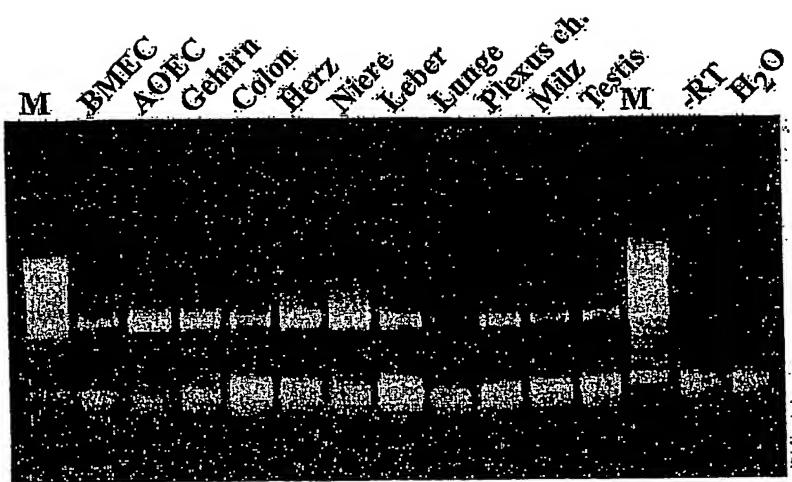
Figur 15

MAALAPLPPPL PAQLKSIQHH LRTAQEHDKR DPVVAYYCRL YAMQTGMKID  
SKTPECRKFL SKLMDOLEAL KKQLGDNEAI TQEIVGCAHL ENYALKMFLY  
ADNEDRAGRF HKNMIKSFYT ASLLIDVITV FGELTDENVK HRKYARWKAT  
YIHNCNKNGE TPQAGPVGIE EDNDIEENED AGAASLPTQP TQPSSSSTYD  
PSNMPSGNYT GIQIPPGAHA PANTPAEVPH STGVASNTIQ PTPQTIPAIID  
PALFNTISQG DVRLTPEDFA RAQKYCKYAG SALQYEDVST AVQNLQKALK  
LLTTGRE

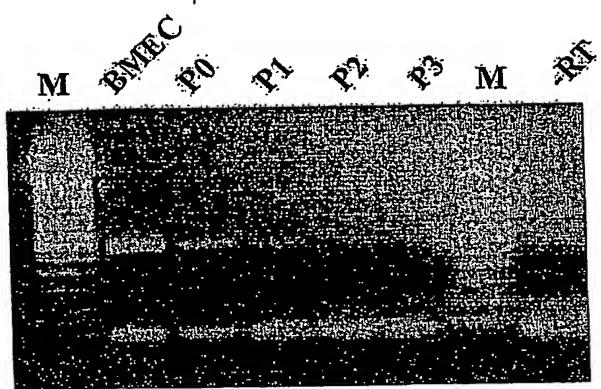
Figur 16

Mensch	MAALAPLPLPAQLKSIQHHLRTAQEHDKRDPVVAYYCRLYAMQTGMKIDSKTPECRKFL	60
Maus	MAALAPLPLPAQFKSIQHHLRTAQEHDKRDPVVAYYCRLYAMQTGMKIDS	60
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		
Mensch	SKLMDQLEALKKQLGDNEAITQEIIVGCAHLENVALKMFYADNEDRAGRHFHKNMKSFYT	120
Maus	SKLMDQLEALKKQLGDNEAVTQEIIVGCAHLENVALKMFYADNEDRAGRHFHKNMKSFYT	120
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		
Mensch	ASLLIDVITVFGELTDENVKHRKYARWKATYIHNCNKNGETPQAGPVGIEEDNDIEENED	180
Maus	ASLLIDVITVFGELTDENVKHRKYARWKATYIHNCNKNGETPQAGPVGIEENDVEENED	180
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		
Mensch	AGAASLPTQPTQPSSTYDPSNMPSGNYTGIQIPPGAHAPANTPAEVPHSTGVASNTIQ	240
Maus	VGATSLPTQPPQPSSSAYDPSNLAPGSYSGIQIPPGAHAPANTPAEVPHSTGVTSNAVQ	240
***:***:***:***:***:***:***:*****:*****:*****:*****:*****:***:***		
Mensch	PTPQTIP---AIDPALFNTISQGDVRLTPEDFARAQKYCKYAGSALQYEDVSTAVQNLQK	297
Maus	PSPQTVPAAAPAVPDLY-TASQGDIRLTPEDFARAQKYCKYAGSALQYEDVGTAVQNLQK	299
*:***:***:***:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		
Mensch	ALKLLTTGRE 307	
Maus	ALRLLLTTGRE 309	
**:*****		

Figur 17



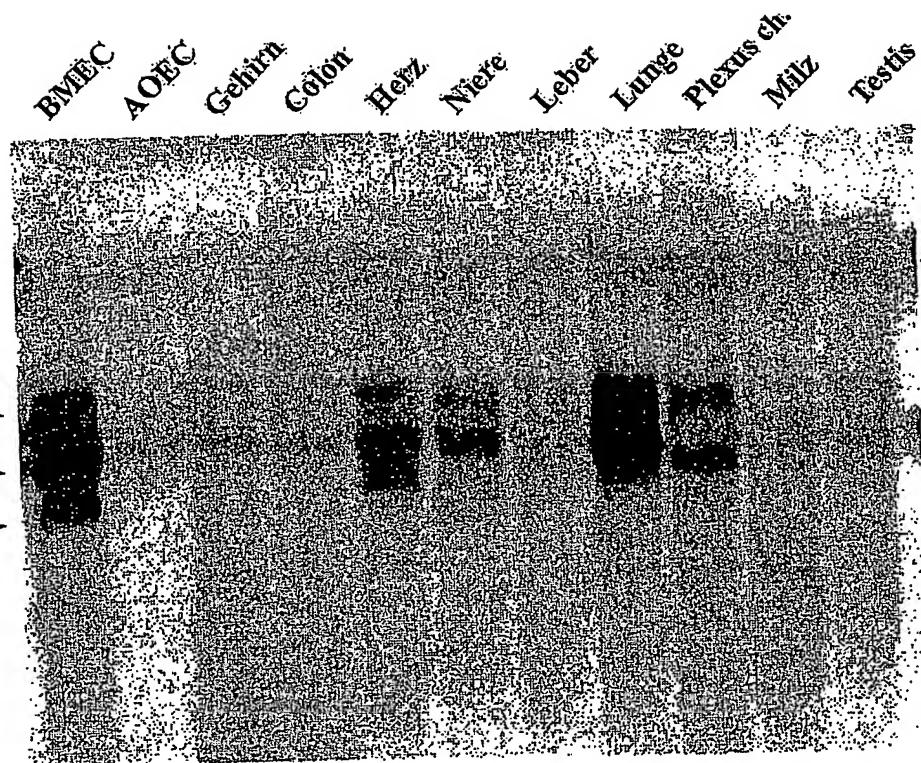
**Figur 18**



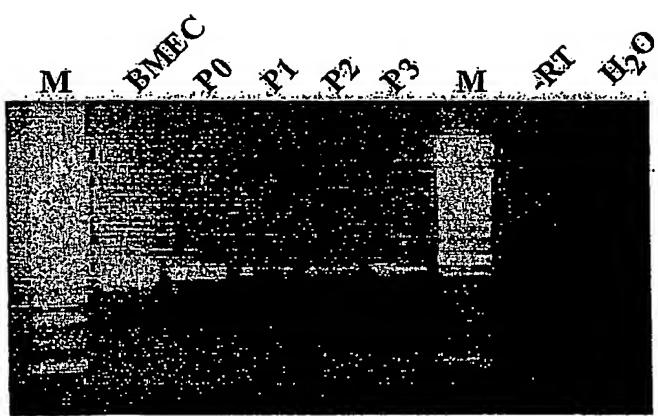
**Figur 19**

MAAPEPLRPR LCRLVRGEQG YGFHLHGEKG RRGQFIRRVE PGSPAEEAAL  
AGDRLVEVNG VNVEGETHHQ VVQRIKAVEG QTRLLVVDQE TDEELRRQL  
TCTEEEMAQRG LPPAHDWPWEP KPDWAHTGSH SSEAGKKDVS GPLRELRPRL  
CHLRKGPOGY GFNLHSDKSR PGQYIRSVDP GSPAARSGLR AQDRLIEVNG  
QNVEGLRHAE VVASIKARED EARLLVVDPE TDEHFKRLRV TPTEEHVEGP  
LPSPVTNGTS PAQLNGGSAC SSRSDLPGSD KDTEDGSAWK QDPFQESGLH  
LSPTAAEARR RLEPCESTSA RHRWTGTGSV KSSATSEPLP ACLGTLGPLP  
HGPWASACPE LPQPQWTGGW SCHCPEISPS PGEPPSCPCP PGTGGLWQOD  
RGRETQRcer ESETETERER ERHRERQRES ERARGSRGAR AFAALPGPAD

Figur 20



**Figur 21**



**Figur 22**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**